



Universidad de Buenos Aires



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires



CETA



ESTUDIOS TENDIENTES A ESTABLECER EL COMPORTAMIENTO AMBIENTAL DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS EN AMBIENTES ACUÁTICOS DE TRES ARROYOS, PROVINCIA DE BUENOS AIRES.

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Producción Animal.

Autora: Melina Andrea Álvarez

Directora: Cecile Marie du Mortier Podesta
CETA (UBA)

INPA (UBA-CONICET)

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, 2014

*“Investigar es ver lo que todos ven y pensar lo que nadie
ha pensado”*

A. Szent – Györgi

A mis papás,

Liliana y Osvaldo

Por su eterno amor y apoyo incondicional.

A mis ángeles Saúl y Tina que me cuidan desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Liliana y Osvaldo por ser mis compañeros de campañas y aventuras. Esta tesis no hubiera sido posible sin ustedes, los amo, gracias por todo.

A mi segunda mamá y amiga la Dra Cecile du Mortier Podesta por ser primero mi co-directora y luego mi directora de tesis. Gracias por darme libertad y permitirme realizar todo aquello que me pareció enriquecedor para esta tesis.

A Andrés Venturino por permitirme realizar una pasantía en la Universidad del Comahue, por ser tan buena persona y estar siempre predispuesto a ayudarme con los capítulos de esta tesis los cuales no hubieran sido posibles sin su colaboración.

A toda mi familia y a mi amor Martin por darme apoyo y ánimo en los momentos difíciles.

A mis amigos del laboratorio Esteban Avigliano, Maria Laura Ramos, Hernán Agostini, Lila Ramis, Roberta Callico, Nahuel Schenone, Natalia Yoshida, Fernanda Vazquez, Cecilia Blas y Matías Muñoz.

A la Dra Alicia Fernandez Cirelli, por darme la posibilidad de realizar el doctorado dentro de su grupo de trabajo y abrirme las puertas del CETA sin siquiera conocerme.

A Alejandra Volpedo por las correcciones de la tesis, por sus consejos y amistad.

A Alejo Pérez Carrera por su apoyo y asesoramiento.

A Oscar y Mauricio Zicchieri por ser mis pescadores y amigos. Muchas gracias.

A Laura Carbonelli por su amistad y buena predisposición a ayudarme siempre.

A Susana Rojas por los ricos mates y su ayuda hasta altas horas de la noche con las extracciones de la biota!

A toda la cátedra de Química Orgánica de Biomoléculas, al Centro de Estudios Transdisciplinarios del Agua, al CONICET y a la Facultad de Ciencias Veterinarias, por permitirme realizar esta tesis.

A mis amigas del alma Lucila Alvarez y Cecilia Arana, por estar siempre, en los buenos y malos momentos, acompañándome durante tantos años de amistad.

A mi abuelito Saúl que no podrá presenciar la defensa de mi tesis y que siempre estuvo tan orgulloso de mí. Te amo.

**ESTUDIOS TENDIENTES A ESTABLECER EL COMPORTAMIENTO
AMBIENTAL DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS EN AMBIENTES
ACUÁTICOS DE TRES ARROYOS, PROVINCIA DE BUENOS AIRES**

El partido de Tres Arroyos se ubica en la zona sudoeste de la provincia de Buenos Aires. Éste se caracteriza por ser una zona de agricultura intensiva con una elevada producción de cereales de invierno y oleaginosas. Anualmente se aplican elevadas cantidades de diferentes pesticidas entre los cuales se encuentran los organofosforados, particularmente el clorpirifos. El efecto de los insecticidas ha sido ampliamente estudiado a nivel mundial dado la gran preocupación de los efectos que muchos de estos compuestos producen sobre los organismos no-blanco y el deterioro que generan sobre la calidad de los recursos hídricos. Los organismos que habitan estos cuerpos de agua son afectados por el clorpirifos, y otros compuestos organofosforados, a nivel del sistema nervioso y otras vías metabólicas que son cruciales para su supervivencia. En Argentina existen algunos trabajos que se refieren a este insecticida, pero ninguno que se haya realizado en nuestra zona de estudio como así tampoco en los cuales se considere su afinidad o tiempo de vida media en suelos de nuestra región.

Entender la diseminación y el comportamiento de este insecticida en el ambiente es clave para determinar su destino e impacto sobre el mismo. Por ello, a lo largo de esta tesis se han realizado estudios de interacción y recuperación de clorpirifos, puro y en una formulación comercial, con matrices sólidas (suelos, sedimentos) de diferentes características físico-químicas; se ha evaluado el tiempo de vida media en suelos a distintas concentraciones iniciales; se abordó el análisis físico-químico del agua y la concentración de nutrientes y clorpirifos, relacionando los resultados con las actividades agropecuarias de la zona; se ha estudiado también su existencia en sedimentos y biota acuática; se han analizado las respuestas de biomarcadores bioquímicos como herramientas de monitoreo en larvas de

Rhinella arenarum expuestas hasta 96 horas a muestras de agua de Claromecó y Tres Arroyos. Finalmente se evaluó el riesgo que este insecticida estaría generando a las concentraciones halladas en nuestra zona de estudio.

Los estudios de comportamiento sobre matrices sólidas muestran que el clorpirifos puro (98%) se recupera menos cuando los suelos poseen alto contenido de materia orgánica y bajo pH. Los porcentajes de recuperación del clorpirifos variaban según las concentraciones iniciales empleadas, siendo menores a mayor concentración inicial del producto. Al analizarse el comportamiento de un formulado comercial (48% de clorpirifos), se observó el efecto contrario, ya que los porcentajes de recuperación aumentaron con el aumento de la concentración inicial aplicada sobre el suelo, hasta que se alcanzó una concentración aproximada de 25 ppm, a partir de la cual la recuperación comenzó a disminuir. Cuando se estudió la persistencia de esta formulación sobre un suelo agrícola de la provincia de Buenos Aires se observaron tiempos de vida media de 15 y 6 días para las concentraciones de 3 y 6 ppm respectivamente. En ambos casos se encontró una degradación del 99,9% a los 21 días.

En relación a la concentración de clorpirifos en agua y sedimentos del partido de Tres Arroyos, se observó una variación estacional con los tipos de cultivos producidos en la zona. Los mayores valores de concentración en agua se observaron durante el año 2009, tanto en las campañas de invierno como de verano. En cambio en los sedimentos, las concentraciones fueron más variables y poco predecibles.

En los estudios realizados sobre la biota del lugar, los resultados en ejemplares de *Australoheros facetus* (chanchita), *Oligosarcus jenynsii* (dientudo), *Rhamdia quelen* (bagre sapo), *Mugil sp.* (lisa) y *Cyrtograpsus angulatus* (cangrejo de las rocas) mostraron que la concentración de clorpirifos variaba con el tipo de tejido y el contenido graso de los mismos. En todas las especies de peces analizadas se observó una mayor concentración del insecticida en cerebro, hígado y gónadas que son tejidos con alto contenido graso. En *O. jenynsii* y *A. facetus* se observó que los machos se encontraban el doble de contaminados que las hembras, mientras que en la especie *R. quelen* se observó lo inverso, siendo en éstas de diez veces mayor. Por otra parte, las mayores concentraciones se hallaron en ejemplares de *R. quelen* (Bagre sapo) y *A. facetus* (Chanchita), que son especies que viven asociadas al fondo. El cangrejo de las rocas mostro valores de clorpirifos de hasta 157 veces menor que las especies de peces y no hubo diferencias entre sexos.

Las respuestas de los biomarcadores bioquímicos en larvas de *Rhinella arenarum* mostraron que, si bien las aguas de la zona presentaron trazas de clorpirifos, no se afectó al blanco primario AChE. Sin embargo, se obtuvieron respuestas significativas de CE, GST y GSH además de una fuerte respuesta antioxidante de CAT, aunque no descartamos la posibilidad de presencia de otros contaminantes no detectados en el análisis químico.

En el caso del estudio de niveles de nutrientes en agua, se llegó a la conclusión que estos dependen de una multiplicidad de factores y que son de muy difícil predicción. Los resultados mostraron por un lado, que los rangos de concentración de nitratos no variaron en las campañas de invierno y verano, y por el otro, que la concentración de fósforo fue sumamente elevada durante todo el año con picos en primavera y verano.

Finalmente, nuestros resultados revelan que por un lado, existen niveles de riesgo agudo y crónico elevados para algunas especies de invertebrados y vertebrados acuáticos, como así también un riesgo potencial para la salud de la población local.

Palabras clave: clorpirifos, interacción con suelos, tiempo de vida media, biomarcadores bioquímicos, biota acuática y riesgo ecológico.

**STUDIES TENDING TOWARDS THE ASSESSMENT OF THE BEHAVIOR
OF THE INSECTICIDE CHLORPYRIFOS IN AQUATIC ENVIRONMENTS
OF TRES ARROYOS, PROVINCIA DE BUENOS AIRES.**

Tres Arroyos area is located Southwest Buenos Aires province. In this area, intensive agricultural practices take place with high yields of winter cereals and oilseeds. Anually, large amounts of different plaguicides are employed, including organophosphates, in particular, chlorpyrifos. The effect of insecticides has been studied worldwide because of the great concern with the effects that many of these compounds have on non- target organisms and the impact they can have on water quality. The organisms that live in water bodies located in agricultural zones can be affected by chlorpyrifos and other organophosphate plaguicides at the nervous system level and other metabolic pathways. There are several studies on chlorpyrifos in Argentina but none in our study zone. Also, no studies have been performed regarding its behavior on solid matrices (soils, sediments) characteristic of our region.

Understanding dissemination and behavior of this insecticide is crucial to assess its impact and final fate on the environment. In this thesis, studies of interaction and recovery of chlorpyrifos, pure and in commercial formulations, on solid matrices with different physicochemical characteristics have been performed. In addition, half-life times have been evaluated on soils with different initial concentrations of chlorpyrifos. In aquatic environments of Tres Arroyos district, physicochemical analysis of water was conducted and concentrations of nutrients (nitrate, phosphate) and chlorpyrifos were assessed and associated with local agricultural practices. Sediments and aquatic biota have been analyzed for chlorpyrifos. The responses of *Rhinella arenarum* larvae exposed for up to 96 hours to

water samples from Claromecó and Tres Arroyos have been studied. To complete these studies, an assessment of the risk that this insecticide could create at the concentrations found in the study area was carried on.

Studies of behavior on solid matrices show that recoveries of pure chlorpyrifos (98%) are lower on matrices with high organic matter contents and low pH. Recoveries depend on the initial concentrations applied. When a commercial formulation (48% chlorpyrifos) was assayed, recovery percentages increased with the initial concentration of up to 25 ppm. When concentrations higher than 25 ppm were employed, recovery started to decrease. Half-time lifes of 15 and 6 days were determined for initial concentrations of 3 and 6 ppm of chlorpyrifos when persistence on an agricultural soil of Buenos Aires province was studied. In both cases degradation was 99,9 % after 21 days.

When water and sediments from aquatic environments of Tres Arroyos were analyzed for chlorpyrifos, seasonal variations were observed related to crops. The highest concentrations in water were observed in 2009, in winter and summer campaigns. Concentrations of chlorpyrifos in sediments were hard to relate to seasonal variations.

In the analysis of chlorpyrifos on local biota, results from *Australoheros facetus* ("chanchita"), *Oligosarcus jenynsii* ("dientudo"), *Rhamdia quelen* ("bagre sapo"), *Mugil sp.* ("lisa") y *Cyrtograpsus angulatus* ("cangrejo de las rocas") showed dependence in concentration of chlorpyrifos with the type of tissue and its lipid content. In all species, higher concentrations were observed in brain, liver and gonads. In *O. jenynsii* and *A. facetus*, males were twice as contaminated as females, while in *R. quelen*, the opposite was observed. On the other hand, the highest concentrations were found in specimens of *R. quelen* and *A. facetus*, species that live near the bottom of streams. *C. angulatus* (cangrejo de las rocas) exhibited chlorpyrifos values up to 157 times smaller than fish species and did not show differences between males and females.

Biochemical biomarkers responses on *Rhinella arenarum* larvae suggested that, even when water samples contained chlorpyrifos traces, primary target AChE was not affected. Nevertheless, significant responses of CE, GST and GSH were obtained together with a strong antioxidant response of CAT, though we cannot rule out the influence of other pollutants not detected in chemical analysis.

In the assessment of nutrient (nitrate, phosphate) levels in water, we concluded that they depend on a number of factors and are hard to predict. Nitrate levels did not vary significantly between winter and summer campaigns. On the other hand, phosphate concentrations were extremely high all year round with maximums in spring and summer.

Risk assessment revealed high levels of acute and chronic risk for some species of aquatic invertebrates and vertebrates and potential risk for local population health.

Key words: chlorpyrifos, interaction with soils, half-life, molecular biomarkers, aquatic biota and ecological risk.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1.	Las modificaciones en el paisaje y los primeros colonizadores	1
1.2.	Evolución de los sistemas de producción en Argentina y su relación con el incremento de productos fitosanitarios	4
1.3.	Los plaguicidas en la historia mundial	6
1.4.	Clasificación de los plaguicidas	8
1.5.	Principales grupos de insecticidas	10
1.6.	Insecticida clorpirifos	
1.6.1.	Características físico-químicas	15
1.6.2.	Principales productos de degradación del clorpirifos	17
1.6.3.	Evidencias de bioconcentración y efectos del clorpirifos sobre las comunidades acuáticas	19
1.6.4.	Evidencias de toxicidad del clorpirifos en Argentina sobre invertebrados Acuáticos	23
1.6.5.	Efectos sobre los seres humanos	25
1.7.	HIPÓTESIS	27
1.8.	OBJETIVOS	
1.8.1.	OBJETIVO GENERAL	27
1.8.2.	OBJETIVOS PARTICULARES	27
1.9.	REFERENCIAS	29

PARTE I: ESTUDIOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO DEL CLORPIRIFOS SOBRE MATRICES SÓLIDAS

CAPÍTULO 2: COMPORTAMIENTO DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS EN SUELOS Y SEDIMENTOS CON DIFERENTE CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

2.1.	INTRODUCCIÓN	39
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	
2.2.1.	Origen de las muestras	42
2.2.2.	Caracterización de las matrices	43
2.2.3.	Preparación de las matrices	44
2.2.4.	Extracción	44

2.2.5.	Cuantificación de clorpirifos	45
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
2.4.	CONCLUSIONES	48
2.5.	BIBLIOGRAFÍA	50

CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LA PERSISTENCIA DE UN FORMULADO COMERCIAL DE CLORPIRIFOS EN UN SUELO AGRÍCOLA DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

3.1.	INTRODUCCIÓN	53
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	
3.2.1.	Origen de las muestras de suelo	55
3.2.2.	Caracterización del suelo utilizado en los estudios de interacción y Persistencia	56
3.2.3.	Preparación de los suelos para los estudios de interacción y persistencia	56
3.2.4.	Cálculo de la capacidad de campo de los suelos	57
3.2.5.	Recuperación de clorpirifos en los experimentos de persistencia (vida media)	58
3.2.6.	Recuperación del formulado comercial de clorpirifos	58
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.3.1.	Estudios de recuperación del formulado comercial de clorpirifos	59
3.3.2.	Persistencia del clorpirifos comercial	60
3.4.	CONCLUSIONES	63
3.5.	REFERENCIAS	64

PORTE II: ESTUDIOS EN MATRICES AMBIENTALES DEL PARTIDO DE TRES ARROYOS

II.1.	INTRODUCCIÓN	68
II.1.1.	Marco geográfico	69
II.1.2.	El Arroyo Claromecó y sus conflictos de usos	70
II.1.3.	Economía de la zona	75
II.1.4.	Plaguicidas utilizados en el control de plagas de los principales cultivos	79
II.1.5.	Área de estudio	80
II.2.	REFERENCIAS	85

CAPÍTULO 4: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATOS Y FOSFATOS EN MUESTRAS DE AGUA DEL PARTIDO DE TRES ARROYOS

4.1.	INTRODUCCIÓN	90
4.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	91
4.2.1.	Muestras de agua	
4.2.1.1.	Análisis de parámetros químicos in situ	91
4.2.1.2.	Determinación de nutrientes	91
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
4.4.	CONCLUSIONES	101
4.5.	REFERENCIAS	103

Capítulo 5: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORPIRIFOS EN MUESTRAS DE AGUA Y SEDIMENTO EN EL PARTIDO DE TRES ARROYOS

5.1.	INTRODUCCIÓN	107
5.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	
5.2.1.	Toma de muestras a campo en las distintas matrices	110
5.2.1.1.	Muestras de agua	110
5.2.1.2.	Muestras de sedimento	111
5.2.2.	Extracción de clorpirifos en las distintas matrices	111
5.2.2.1.	Muestras de agua	111
5.2.2.2.	Muestras de sedimento	111
5.2.3.	Cuantificación de clorpirifos	111
5.2.4.	Transferencia de clorpirifos desde los sedimentos al agua	111
5.2.5.	Análisis estadístico	112
5.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.3.1.	Agua	
5.3.1.1.	Concentración de clorpirifos	112
5.3.1.2.	Parámetros físico-químicos y su relación con la concentración de clorpirifos	116
5.3.2.	Sedimento	
5.3.2.1.	Concentración de clorpirifos	120
5.3.2.2.	Parámetros físico-químicos y su relación con la	123

	concentración de clorpirifos	
5.3.3.	Concentración de clorpirifos y su relación con las actividades agropecuarias de la zona	125
5.3.4.	Transferencia de clorpirifos desde los sedimentos al agua	127
5.6.	CONCLUSIONES	130
5.7.	REFERENCIAS	131

CAPÍTULO 6: PRESENCIA DE CLORPIRIFOS EN BIOTA ACUÁTICA DE LA LOCALIDAD DE CLAROMECO

6.1.	INTRODUCCIÓN	135
6.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	138
6.2.1.	Características biológicas de las especies estudiadas	141
6.2.2.	Extracción y análisis de clorpirifos	146
6.2.3.	Análisis estadístico	148
6.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.3.1.	Peces	
6.3.1.1.	Datos morfométricos	149
6.3.1.2.	Análisis de las concentraciones y proporciones de clorpirifos halladas en las especies bentónicas	
6.3.1.2.1.	<i>Rhamdia quelen</i>	152
6.3.1.2.2.	<i>Australoheros facetus</i>	156
6.3.1.2.3.	Comparación de la cantidad de clorpirifos entre <i>A. facetus</i> y <i>R. quelen</i>	160
6.3.1.3.	Análisis de las concentraciones y proporciones de clorpirifos halladas en las especies nectónicas	
6.3.1.3.1.	<i>Oligosarcus Jenynsii</i>	162
6.3.1.3.2.	<i>Mugil liza</i>	165
6.3.1.3.3.	Comparación de las proporciones de clorpirifos entre <i>O. jenynsii</i> y <i>M. liza</i>	167
6.3.1.4.	Comparación de las proporciones de clorpirifos entre los órganos de <i>O. jenynsii</i> , <i>R. quelen</i> , <i>A. facetus</i> y <i>Mugil liza</i>	168

6.3.2.	Invertebrados: <i>Cyrtograpsus angulatus</i>	
6.3.2.1.	Datos morfométricos y análisis de las concentraciones y proporciones de clorpirifos halladas en los diferentes tejidos de <i>Cyrtograpsus angulatus</i>	173
6.4.	CONCLUSIONES	178
6.5.	REFERENCIAS	180

CAPÍTULO 7: EXPOSICIÓN DE LARVAS DE R. ARENARUM A AGUAS DE LA ZONA AGRÍCOLA DE TRES ARROYOS Y CLAROMECÓ SOBRE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN Y RESPUESTA A AGROQUÍMICOS

7.1.	INTRODUCCIÓN	186
7.1.1.	Metabolización de los organofosforados y modo de acción	190
7.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	
7.2.1.	Estudios a campo	
7.2.1.1.	Muestras de agua	194
7.2.2.	Estudios en el laboratorio	
7.2.2.1.	Análisis químico de agua y cuantificación de pesticidas	195
7.2.3.	Material Biológico	
7.2.3.1.	Antecedentes de clorpirifos en la zona de estudio	195
7.2.3.2.	Obtención de embriones, inducción de las ovulaciones y fertilización	196
7.2.3.3.	Exposición de <i>Rhinella arenarum</i> al agua muestreada	198
7.2.4.	Material químico	199
7.2.5.	Determinaciones enzimáticas	199
7.2.5.1.	Concentración de proteínas totales	200
7.2.5.2.	Actividad de la colinesterasa (AChE)	200
7.2.5.3.	Carboxilesterasas (Aliesterasas)	201
7.2.5.4.	Glutación S-transferasa (GSH S-aril transferasa)	202
7.2.5.5.	Contenido de glutatión reducido (Tioles de ácido solubles) mediante el método de Ellman (modificado)	203
7.2.5.6.	Peróxidos lipídicos por malondialdehído (MDA). Método del ácido tiobarbitúrico (TBA)	204

7.2.5.7.	Actividad específica de la Catalasa	205
7.2.6.	Análisis de datos y estadística	206
7.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	206
7.3.1.	Pesticidas detectados en el agua	
7.3.2	Efectos de las aguas sobre el sistema de defensa antioxidante	
7.3.2.1.	Actividad de la catalasa	207
7.3.2.2.	Actividad de la GST	210
7.3.2.3.	Nivel de glutatión reducido	213
7.3.2.4.	Nivel de peróxidos	216
7.3.3.	Efectos sobre blancos primarios y secundarios de contaminantes	
7.3.3.1.	Actividad de la Acetilcolinesterasa (AChE)	218
7.3.3.2.	Actividad de la Carboxilesterasa (CE)	219
7.3.3.3.	Niveles de proteínas	221
7.4.	CONCLUSIONES	222
7.5.	REFERENCIAS	224

CAPÍTULO 8: EVALUACIÓN DE RIESGO ECOLÓGICO DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS EN LOS AMBIENTES ACUÁTICOS DE TRES ARROYOS Y CLAROMECÓ

8.1.	INTRODUCCIÓN	
8.1.1.	Descripción de la evaluación de riesgo ecológico	228
8.1.2.	Métodos utilizados para los análisis de riesgo de pesticidas	230
8.1.3.	Niveles o “tiers” en el análisis de riesgo	233
8.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	
8.2.1.	Evaluación de riesgo ecológico	237
8.2.1.1.	Método semi-cuantitativo	238
8.2.1.2.	Métodos cuantitativos	
8.2.1.2.1.	Distribución de la sensibilidad	239
8.2.1.2.2.	Probabilidad de excedencia	241
8.3.	RESULTADOS	
8.3.1.	Evaluación de riesgo ecológico	
8.3.1.1.	Métodos semi-cuantitativos	241
8.3.1.2.	Estudios cuantitativos	244
8.4.	DISCUSIÓN	251

8.5.	CONCLUSIONES	253
8.6.	REFERENCIAS	255

CAPÍTULO 9:	CONSIDERACIONES FINALES	270
--------------------	--------------------------------	------------

ANEXOS

ANEXO AI: CRITERIO DE CALIDAD DE SEDIMENTOS (SQC)

AI.1.	INTRODUCCIÓN	264
AI.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	266
AI.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	267
AI.4.	CONCLUSIONES	268
AI.5.	REFERENCIAS	269

ANEXO AII: PUBLICACIONES Y CONGRESOS

AII.1.	PUBLICACIONES	
	AII.1.1 REVISTAS INTERNACIONALES	271
AII.2.	CONGRESOS	
	AII.2.1. CONGRESOS NACIONALES	271
	AII.2.2. CONGRESOS INTERNACIONALES	275

CAPÍTULO 1

Fotografía 1.1. Maquinaria agrícola de Río Tercero, 1920.	3
	11
Figura 1.1. Ejemplos de compuestos organofosforados.	12
Figura 1.2. Ejemplos de compuestos organoclorados	13
Figura 1.3. Ejemplos de compuestos carbamatos.	14
Figura 1.4. Ejemplos de piretroides.	14
Figura 1.5. Estructuras de los dos herbicidas más vendidos de Argentina	16
Figura 1.6. Estructura del clorpirifos	18
Figura 1.7. Estructura del TCP	21
Figura 1.8. Principales rutas de entrada y eliminación de compuestos tóxicos en peces.	

Parte I: Estudios realizados en laboratorio sobre la interacción y tiempo de vida media del clorpirifos**CAPÍTULO 2**

Figura 2.1. Principales procesos que afectan la movilidad y persistencia de los plaguicidas en la biosfera.	41
	43
Figura 2.2. Localización de los sitios de muestreo	46
Figura 2.3. Recuperación (porcentaje de la concentración inicial) de clorpirifos en la matriz A. Las barras de error son las desviaciones estándar (SD).	46
Figura 2.4. Recuperación (porcentaje de la concentración inicial) de clorpirifos en la matriz B. Las barras de error son las desviaciones estándar (SD).	47
Figura 2.5. Recuperación (porcentaje de la concentración inicial) de clorpirifos en la matriz C. Las barras de error son las desviaciones estándar (SD).	

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Localización del sitio de muestreo	55
Figura 3.2. Recuperación de clorpirifos comercial calculada como el porcentaje recuperado de la concentración inicial aplicada ($\%R = (Cf/Ci)*100$).	59
Figura 3.3. Degradación de clorpirifos a una concentración inicial de 3 ppm.	62
Figura 3.4. Degradación de clorpirifos a una concentración inicial de 6 ppm.	62

Parte II: Estudios en matrices ambientales del partido de Tres Arroyos

Figura II.1. Ubicación del área de estudio dentro de la región Argentina denominada la Pampa o Pampa Austral.	69
Figura II.2. Se observan las isoyetas (mm/año) en los distintos sectores de la pampa. El sector 3 corresponde a la zona de Tres Arroyos denominada "Southern Pampa"	70
Figura II.3. Se observan varios tramos del Arroyo Claromecó.	72
Figura II.4. Se observan las superficies sembradas (Ha) de los principales cultivos de la zona de Tres Arroyos.	76
Figura II.5. Se observan las toneladas producidas de los principales cultivos de la zona de Tres Arroyos.	77
Figura II.6. Meses de siembra y cosecha para los principales cultivos de Tres Arroyos.	78
Figura II.7. Distancia por la Ruta Nacional N°3 desde Buenos Aires hasta la localidad de Tres Arroyos, provincia de Buenos Aires.	81
Figura II.8. Distancia por la Ruta Nacional N°73 desde la localidad de Tres Arroyos hasta Claromecó.	81
Figura II.9. Ubicación geográfica de los arroyos 1, 2 y 3 de la localidad de Tres Arroyos, provincia de Buenos Aires.	82
Figura II.10. Se observan los sitios en donde fueron recolectadas las muestras en la localidad de Tres Arroyos. Las fotos corresponden a los arroyos 1, 2 y 3 de izquierda a derecha.	83
Figura II.11. Se observan los sitios en donde se han tomado las muestras en la localidad balnearia de Claromecó.	83
Figura II.12. Acercamiento de la desembocadura del arroyo Claromecó.	84

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Precipitaciones (mm) registradas los meses de mayo y noviembre de 2009.	92
	93
Figura 4.2. Precipitaciones (mm) registradas los meses de mayo y noviembre de 2009.	93
Figura 4.3. Precipitaciones (mm) registradas los meses de noviembre de 2011 y abril de 2012.	

CAPÍTULO 5

Figura 5.1. Correlación lineal de Pearson para la concentración hallada de clorpirifos en el agua ($\mu\text{g/l}$) en los arroyos 1 y 2 de Tres Arroyos.	116
	126
Figura 5.2. Concentraciones máximas de clorpirifos en agua ($\mu\text{g/l}$) y su relación con los cultivos de invierno y verano, en las diferentes estaciones de muestreo del Partido de Tres Arroyos.	127
Figura 5.3. Concentraciones máximas de clorpirifos en los sedimentos ($\mu\text{g/kg}$) y su relación con los cultivos de invierno y verano, en las diferentes estaciones de muestreo del Partido de Tres Arroyos.	

CAPÍTULO 6

Figura 6.1. Variables registradas (LS y LT) en las distintas especies de peces.	139
	139
Figura 6.2a y 6.2b. Se observan las diferencias morfológicas entre los sexos de <i>C. angulatus</i> en sus caras ventrales. En la figura 6.2a se observa una hembra y en la 6.2.b un macho de cangrejo de las rocas	140
Figura 6.3. Variables morfométricas registradas en machos y hembras de <i>C. angulatus</i> .	140
Figura 6.4a y 6.4b. Extracción de órganos y separación de los mismos en papel de aluminio.	147
Figura 6.5a y 6.5b. El homogenato en un earlenmeyer se mezcla durante una hora a 37 °C con 40 ml de hexano.	148
Figura 6.6. El Hexano se concentra a 5 ml en un rotavapor.	148
Figura 6.7. Los 5 ml se pasan por una columna con 4 g de florisil y 1 g de Na_2SO_4 , para extraer los lípidos. La columna se lava con 200 ml de una mezcla de hexano: acetato de	

etilo (94:6).	153
Figura 6.8. Comparación de proporciones medias de clorpirifos (\pm SD) en machos y hembras de <i>Rhamdia quelen</i> .	154
Figura 6.9. Media de las proporciones de clorpirifos en los tejidos analizados de <i>Rhamdia quelen</i> sin considerar el sexo de los ejemplares.	155
Figura 6.10. Comparación de las proporciones medias de clorpirifos (\pm SD) en hembras de <i>Rhamdia quelen</i> .	158
Figura 6.11. Media de las proporciones de clorpirifos en tejidos de machos y hembras de <i>A. facetus</i>	158
Figura 6.12. Media de las proporciones de clorpirifos en los tejidos analizados de <i>A. facetus</i> sin considerar sexo.	159
Figura 6.13. Medias de las proporciones de clorpirifos en tejidos de machos de <i>A. facetus</i> . Las letras diferentes indican diferencias significativas. ND: no detectable.	160
Figura 6.14. Media de las proporciones de clorpirifos en los tejidos analizados de <i>Australoheros facetus</i> y <i>Rhamdia quelen</i> .	161
Figura 6.15. Media de las proporciones de clorpirifos (\pm SD) halladas en cerebro de hembras de <i>Australoheros facetus</i> y <i>Rhamdia quelen</i> .	162
Figura 6.16. Media de las proporciones de clorpirifos (\pm SD) halladas en gónadas de hembras de <i>Australoheros facetus</i> y <i>Rhamdia quelen</i> .	164
Figura 6.17. Medias de las proporciones de clorpirifos en tejidos de machos y hembras de <i>Oligosarcus jenynsii</i> .	164
Figura 6.18. Media de las proporciones de clorpirifos en <i>Oligosarcus Jenynsii</i> (media \pm SD) en los distintos órganos (n=5) sin considerar el sexo de los ejemplares.	167
Figura 6.19. Media de las proporciones de clorpirifos en <i>Mugil liza</i> (Media \pm SD) en los distintos órganos (n=6).	168
Figura 6.20. Media de las proporciones de clorpirifos en los tejidos analizados de <i>Oligosarcus jenynsii</i> y <i>Mugil liza</i>	171
Figura 6.21. Medias de las proporciones de clorpirifos halladas en los hígados de <i>O. Jenynsii</i> , <i>M. liza</i> , <i>A. facetus</i> y <i>R. quelen</i> .	172
Figura 6.22. Medias de las proporciones de clorpirifos halladas en los cerebros de <i>O. Jenynsii</i> , <i>M. liza</i> , <i>A. facetus</i> y <i>R. quelen</i> .	

Figura 6.23. Medias de las proporciones de clorpirifos halladas en los músculos de <i>O. Jenynsii</i> , <i>M. liza</i> , <i>A. facetus</i> y <i>R. quelen</i> .	172
Figura 6.24. Media de las proporciones de clorpirifos en los tejidos analizados de <i>Cyrtograpsus angulatus</i> . No se observaron diferencias significativas en la prueba de Frieman ($X^2=3,0857$) ($p= 0,3786$).	176
 <u>CAPÍTULO 7</u>	
Figura 7.1. Amplexo en el agua de <i>Rhinella arenarum</i>	188
Figura 7.2. Metamorfosis de los anuros. Las 3 fases esenciales del desarrollo son: huevo, embrión y larva. Los procesos que dan origen o señalan el comienzo de la fase siguiente son: fecundación, eclosión y metamorfosis. Cada una de estas fases comprende un gran número de etapas (25 estadios).	189
Figura 7.3. Estructura general de los plaguicidas OFs. El doble enlace se da entre el átomo de fosforo central y un oxígeno o azufre. El grupo saliente es específico de cada OFs.	190
Figura 7.4. Representación esquemática de la interacción del clorpirifos oxón con la AChE	192
Figura 7.5. Ovocitos y embriones de <i>Rhinella arenarum</i> . A) Hembra a punto de poner sus huevos. La flecha roja señala la presencia de ovocitos en su cloaca. B) Ovocitos extraídos de la hembra en A). C) Ovocitos ya fertilizados. Fotos: Cecilia Lascano	197
Figura 7.6. Se observan los renacuajos de ambas ovulaciones mantenidos a temperatura ambiente con solución Ringer.	197
Figura 7.7. Esquema de los tratamientos realizados. Las muestras de diferente color muestran las ovulaciones de hembras distintas. Cada hilera horizontal corresponde al agua del mismo sitio de muestreo (cascada 2 e Inicio del A° Claromecó y Arroyo 3 de la localidad de Tres Arroyos). Entre paréntesis se observa la fecha de muestreo.	198
Figura 7.8. Actividad específica de la catalasa (UI/ mg proteína) en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos.	209
Figura 7.9a. Actividad de GST (mUI/mg proteína) en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos. Se observan los valores obtenidos de actividad en cada muestra para cada día analizado	212
Figura 7.9b. Actividad promedio de GST (mUI/ mg proteína) en embriones de <i>Rhinella</i>	213

arenarum expuestos a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos. Los valores que se observan en dicha figura son los promedios de actividad de cada muestra a lo largo de las 96 hs que duró la experiencia.

214

Figura 7.10. Niveles endógenos de GSH (nmol/larva) en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos. Se observan los valores obtenidos de actividad en cada muestra para cada día analizado.

217

Figura 7.11. Niveles endógenos de lipoperóxidos (nmol) en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos a las 48 hs de exposición.

218

Figura 7.12. Actividad específica de la Acetilcolinesterasa (AChE) (mUI/ mg proteína) en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos.

221

Figura 7.13. Actividad específica de la carboxilesterara (CabE) (mUI/ mg proteína) en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos.

222

Figura 7.14. Se observan los niveles promedios de proteína de ambas ovulaciones para cada muestra de agua en todos los días analizados en embriones de *Rhinella arenarum*.

CAPÍTULO 8

Figura 8.1. Niveles 1 y 2 en un análisis de riesgo.

235

236

Figura 8.2. Nivel 3 en un análisis de riesgo.

237

Figura 8.3. Nivel 4 en un análisis de riesgo.

242

Figura 8.4. Se observan los valores de *RQ agudos* para la concentración máxima de clorpirifos (2,78 µg/l) hallada en la localidad de Tres Arroyos.

243

Figura 8.5. Se observan los valores de *RQ agudos* para la concentración mínima de clorpirifos (0,012 µg/l) hallada en la localidad de Tres Arroyos.

244

Figura 8.6. Se observan los valores de *RQ crónicos* para la concentración máxima de clorpirifos (2,78 µg/l) hallada en la localidad de Tres Arroyos, para aquellos grupos taxonómicos que poseen representantes en Argentina.

245

Figura 8.7. Distribución de los valores agudos de toxicidad para la exposición de clorpirifos a diferentes grupos taxonómicos.

246

Figura 8.8. Distribución de los valores crónicos de toxicidad para la exposición de

clorpirifos a diferentes grupos taxonómicos.

247

Figura 8.9. Distribución de probabilidad conjunta para el análisis de riesgo de excedencia.

CAPÍTULO 1

Tabla 1.1. Diferentes tipos de compuestos pesticidas según la plaga que controlan.	9
Tabla 1.2. Propiedades físico-químicas del clorpirifos	16
Tabla 1.3. Productos de degradación del clorpirifos.	18
Tabla 1.4. Valores umbrales de Kow y FBC (factor de bioconcentración) establecidos por los principales entes de regulación ambiental en relación al riesgo de acumulación por organismos acuáticos.	22

Parte I: Estudios realizados en laboratorio sobre la interacción y tiempo de vida media del clorpirifos**CAPÍTULO 2**

Tabla 2.1. Caracterización química de las matrices A, B y C.	44
---	----

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1. Caracterización química del suelo de Navarro.	56
Tabla 3.2. Cinética de la degradación de clorpirifos comercial.	60

Parte II: Estudios en matrices ambientales del partido de Tres Arroyos

Tabla II.1. Principales insecticidas aplicados en los cultivos de cereales, soja, girasol y maíz. Elaboración propia con datos de CASAFE (2011).	79
---	----

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1. Se observan las principales características de los suelos circundantes a los arroyos muestreados.	94
Tabla 4.2. Promedio \pm DE (n=2) de los parámetros físico químicos y de nutrientes en aguas de los arroyos de Tres Arroyos y Claromecó correspondientes a los cultivos de otoño-invierno.	95

Tabla 4.3 Promedio \pm DE (n=2) de los parámetros físico químicos y de nutrientes en aguas de los arroyos de Tres Arroyos y Claromecó correspondientes a los cultivos de primavera-verano.	96
---	----

CAPÍTULO 5

Tabla 5.1. Estadística descriptiva de los valores medios de clorpirifos registrados en el agua ($\mu\text{g/l}$), por fecha, para las cinco estaciones de muestreo.	113
	114
Tabla 5.2. Estadística descriptiva de los valores medios de clorpirifos registrados en el agua ($\mu\text{g/l}$), para cada uno de los sitios de muestreo en todas las campañas realizadas.	115
Tabla 5.3. Concentración media de clorpirifos \pm SD ($\mu\text{g/l}$) en el agua de los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos e inicio y desembocadura del arroyo Claromecó, durante las cuatro campañas realizadas (N=40).	119
Tabla 5.4. Promedio \pm SD (n=2) de los parámetros físico químicos y de nutrientes en los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos correspondientes a los cultivos de otoño-invierno y primavera-verano.	120
Tabla 5.5. Promedio \pm SD (n=2) de los parámetros físico químicos y de nutrientes en aguas del arroyo Claromecó correspondientes a los cultivos de otoño-invierno y primavera-verano.	121
Tabla 5.6. Estadística descriptiva de los valores medios de clorpirifos registrados en el sedimento ($\mu\text{g/Kg}$) para cada uno de los sitios de muestreo.	121
Tabla 5.7. Estadística descriptiva de los valores registrados de clorpirifos en el sedimento ($\mu\text{g/kg}$) por fecha, para las cinco estaciones de muestreo en conjunto.	122
Tabla 5.8. Concentración media de clorpirifos \pm SD ($\mu\text{g/Kg}$) en el sedimento de los arroyos 1,2 y 3 de Tres Arroyos e inicio y desembocadura del arroyo Claromecó, durante las cuatro campañas realizadas (N=40).	128
Tabla 5.9. Valores obtenidos por Gebremariam <i>et al.</i> (2011), % CO ^b valores publicados por los autores que se corresponderían con los valores hallados en nuestras experiencias.	129
Tabla 5.10. Se observan los valores de clorpirifos obtenidos en las muestras de sedimentos en las cuatro campañas realizadas.	

CAPÍTULO 6

Tabla 6.1. Medias (\pm SD) de largo standard (LS), largo total (LT), peso total (PT) y concentración total de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$) para cada especie analizada. Además se presentan los rangos de largo total, peso y de clorpirifos.	150
Tabla 6.2. Coeficientes de la matriz de correlación de Pearson (r) entre los largos totales, pesos totales y concentración total de clorpirifos (p = probabilidad, $p<0,05$).	151
Tabla 6.3. Concentraciones ($\mu\text{g/g}$) de clorpirifos halladas en los diferentes órganos de <i>R. quelen</i> para cada uno de los ejemplares analizados. Se muestran además la media $\pm\text{SD}^*$ de cada órgano y la $\sum \text{Ci}^{**}$ para cada ejemplar.	152
Tabla 6.4. Proporciones de clorpirifos (Ci/Ct) halladas en los diferentes órganos de <i>R. quelen</i> para cada uno de los ejemplares analizados. Se observan además los largos totales (cm) y pesos totales (gr). Las proporciones (Ci/CT) se estimaron calculando la relación entre la concentración de clorpirifos en cada órgano (Ci) sobre la concentración total hallada en cada individuo (CT).	153
Tabla 6.5. Concentraciones de clorpirifos halladas en los diferentes órganos de <i>A. facetus</i> para cada uno de los ejemplares analizados. Se muestran además las medias $\pm\text{SD}^*$ de cada órgano y la $\sum \text{Ci}^{**}$ para cada ejemplar.	156
Tabla 6.6. Proporciones de clorpirifos (Ci/Ct) halladas en los diferentes órganos de <i>A. facetus</i> para cada uno de los ejemplares analizados. Se muestran además los largos totales (cm) y pesos totales (g). Las proporciones (Ci/CT) se estimaron calculando la relación entre la concentración de clorpirifos en cada órgano (Ci) sobre la concentración total hallada en cada individuo (CT).	157
Tabla 6.7. Concentraciones de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$) halladas en los diferentes órganos y ejemplares de <i>O. Jenynsii</i> . Se observan además la Media $\pm\text{SD}^*$ de cada órgano y la $\sum \text{Ci}^{**}$ para cada ejemplar.	163
Tabla 6.8. Proporciones de clorpirifos (Ci/Ct) halladas en los diferentes órganos de <i>O. jenynsii</i> para cada uno de los ejemplares analizados. Se observan además los largos totales (cm) y pesos totales (g). Las proporciones (Ci/CT) se estimaron calculando la relación entre la concentración de clorpirifos en cada órgano (Ci) sobre la concentración total hallada en cada individuo (CT).	163
Tabla 6.9. Concentraciones de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$) halladas en los diferentes órganos y ejemplares de <i>Mugil liza</i> . Se observan las medias de las concentraciones de cada tejido con sus respectivos desvíos.	165
Tabla 6.10. Proporciones de clorpirifos (Ci/Ct) halladas en los diferentes órganos de <i>Mugil liza</i> para cada uno de los ejemplares analizados. Se observan además los largos totales (cm) y pesos totales (g). Las proporciones (Ci/CT) se estimaron calculando la relación entre la concentración de clorpirifos en cada órgano (Ci) sobre la concentración total hallada en cada individuo (CT).	166

Tabla 6.11. Se observan los rangos de ancho (cm), largo (cm) y peso (g) obtenidos para los machos y hembras del cangrejo de las rocas. También se observan las concentraciones totales de clorpirifos (\pm SD) y los rangos de clorpirifos total para cada sexo. 174

Tabla 6.12. Concentraciones de clorpirifos (μ g/g) halladas en los diferentes órganos y ejemplares de *C. angulatus*. Se observan además la Media \pm SD* de cada órgano analizado para cada sexo y la $\sum C_i^{**}$ de todos los órganos para cada ejemplar. 174

Tabla 6.13. Proporciones de clorpirifos (C_i/C_t) halladas en los músculos y branquias de *C. angulatus* para cada uno de los ejemplares analizados. Se observan además los largos (cm), anchos (cm) y pesos totales (g). Las proporciones (C_i/CT) se estimaron calculando la relación entre la concentración de clorpirifos en cada órgano (C_i) sobre la concentración total hallada en cada individuo (CT). 175

Tabla 6.14. Se observan los coeficientes de la matriz de correlación de Pearson (r) entre los largos, anchos, pesos y concentración total de clorpirifos con sus respectivos $p < 0,05$. 176

CAPÍTULO 7

Tabla 7.1. Concentración media de clorpirifos en las muestras de agua ($n=2$) analizadas de los meses de octubre y noviembre de 2011 de Tres Arroyos y Claromecó para el análisis de biomarcadores. 207

CAPÍTULO 8

Tabla 8.1. Resumen de la información obtenida a partir de las Figuras 8.7 y 8.8 de los análisis probit vs log LC50. Referencias: sp=especies; Comáx: concentración máxima; Comín: concentración mínima. 245

Tabla 8.2. Resumen de los valores obtenidos a partir de la Figura 8.9 del análisis de Probabilidad conjunta. 247

Tabla 8.3. Valores utilizados en el análisis de riesgo agudo y de probabilidad conjunta. 248

Tabla 8.4. Valores utilizados en el análisis de riesgo crónico y de probabilidad conjunta. Referencias: NOEC (No Observed Effect Concentración), LOEC (Low Observed Effect Concentration), LOAEL (Lowest Observable Adverse Effects Level), NOAEL (No Observable Adverse Effects Level). 250

ANEXO AI

Tabla AI.1. Valores de SQC estimados para cada tipo de sedimento obtenidos con las ecuaciones 1 y 2

267

-CAPÍTULO 1-

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Las modificaciones en el paisaje y los primeros colonizadores

En la Argentina, la región conformada originalmente por los pastizales pampeanos constituye el ecosistema más alterado por la actividad humana. Son muy pocas las áreas que preservan la antigua fisonomía del paisaje y son más escasos aún los sitios que conservan expresiones de la comunidad vegetal original (Ricklefs, 1997). La implantación de agroecosistemas en la región pampeana ha modificado sustancialmente la composición y la abundancia de las especies que constituían originariamente su flora y su fauna (Burgueño, 2005; Bilenca, 2012).

Los agroecosistemas son ecosistemas que comprenden particularmente la producción agropecuaria de la cual la humanidad depende. Algunos autores lo definen como “el sistema biológico y de recursos naturales manejado por el hombre para producir alimentos como principal propósito”, otros como un ecosistema que es sometido por el hombre a frecuentes modificaciones de sus componentes bióticos y abióticos. Estas modificaciones afectan

prácticamente a todos los procesos estudiados por los ecólogos y abarcan desde el comportamiento de los individuos y la dinámica de las poblaciones hasta la composición de las comunidades y los flujos de materia y energía (Rótolo y Francis, 2008; Bilenca, 2012; Greco y Tonolli, 2012).

Durante más de un siglo, las Pampas, una de las últimas grandes regiones de pastizales y humedales menos desarrolladas del mundo, ha estado enfrentando profundos cambios, tales como agriculturización, urbanización, canalización y regulación de ríos y arroyos, desecamiento y eutrofización del humedal, contaminación por agroquímicos, erosión y sedimentación, y la implantación de industrias generalmente contaminantes. Las actividades agropecuarias han sido el impulsor más importante en la conversión del pastizal y humedal pampeano en tierra agrícola directamente a través de la transformación del pastizal natural en campos de cosecha anual y de cultivo de pasturas (Quirós *et al.*, 2006).

La modificación del paisaje en la provincia de Buenos Aires tiene una larga historia asociada al desarrollo agrícola y ganadero. Los efectos de los factores antrópicos que se introdujeron después de la llegada de los europeos, fueron los modeladores del actual paisaje cultural, con la introducción de especies de animales y vegetales propias del Viejo Mundo. Como resultado de ello, los patrones naturales del paisaje pampeano fueron transformados, aislando espacialmente sus componentes y fragmentándolos en parches (Quirós *et al.*, 2002).

Las revisiones bibliográficas de Burgueño (2005) y Bilenca *et al.* (2012) da cuenta de los diversos cambios que han estado operando en el paisaje de la región durante los últimos 500 años, a partir de la llegada de los conquistadores españoles a Sudamérica.

Hacia fines del siglo XIX y principios del XX, los suelos pampeanos presentaban un alto nivel nutricional, alta estabilidad estructural y todavía mantenían intacta su capacidad de recuperación frente a los disturbios que la agricultura y ganadería podían provocarles. Luego por un período de 30 años comenzaron a utilizarse las tierras con sistemas de labranzas traídas por los agricultores europeos no adaptadas a las condiciones ambientales locales (Fotografía 1.1) (Heredia, 2010).

La utilización incorrecta de estas herramientas produjo la degradación de los suelos con pérdida paulatina de la fertilidad física y química de los mismos, como así también en el deterioro progresivo de la capacidad productiva, los riesgos de sequía, los mayores costos de producción y el descenso de los rendimientos (Casas, 2002; Heredia, 2010).



Fotografía 1.1. Maquinaria agrícola de Río Tercero, 1920. Propiedad de la foto Juan Moriondo. Foto Roberto Britos.

Hacia finales de la Segunda Guerra Mundial se inicia una nueva etapa de transformación tecnológica de la agricultura. Este cambio estuvo caracterizado por: la introducción de cultivares resistentes a la acción de fitopatógenos y de híbridos de maíz que duplicaban la productividad de los materiales disponibles hasta entonces, la aplicación de herbicidas como el 2-4 D que facilitaron la adopción de los nuevos cultivos, y la instalación de empresas dedicadas a la producción de maquinaria agrícola, agroquímicos y de producción y comercialización de semillas. Esta serie de cambios, junto con la incorporación de nuevos cultivos, como el girasol, la cebada y el sorgo, determinaron una intensificación del uso del suelo y un aumento de la productividad. Al mismo tiempo, se crearon en Argentina instituciones como el Instituto de Suelos y Agrotecnia (ISA) y posteriormente el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) que comenzaron a analizar y combatir los efectos de la erosión y a elaborar las primeras cartas de suelos en la década de 1970 (Bilenca y Miñarro, 2004).

1.2. Evolución de los sistemas de producción en Argentina y su relación con el incremento de productos fitosanitarios

El aumento de la producción agroalimentaria es un fenómeno universal y los países más deficitarios son los que han visto crecer sus cosechas de forma más llamativa. En relación a esto Argentina no fue la excepción, es por ello que el aumento de la superficie cultivada trajo como consecuencia un incremento en el uso de agroquímicos como fertilizantes y plaguicidas, requiriendo una lucha cada vez más agresiva contra plagas, parásitos y otros factores nocivos. Por otra parte, en nuestro país se ha visto en estos últimos años un cambio en los sistemas de producción que han pasado de ser extensivos a intensivos en muchos casos y ha generado una gran cantidad de nuevos efluentes de materia orgánica, hormonas, antibióticos, etc.

Debido al carácter intersectorial y a la complejidad de todo el sistema productivo, se hace imprescindible disponer de instrumentos que hagan a la gestión integral en toda la cadena y a la necesidad de preservar la base de recursos naturales para el desarrollo, así como garantizar la seguridad alimentaria y la inserción en los mercados internacionales de los productos de la región.

La información en la cadena agroalimentaria es fundamental para la calidad e inocuidad de los alimentos e insumos. Los animales de granja pueden exponerse a residuos de pesticidas a través de alimentos contaminados. La fuente más común de residuos de pesticidas en alimentos es su uso legítimo (herbicidas, insecticidas y fungicidas) en los cultivos destinados a la producción de alimentos para ganado y otros animales de granja. Una vez ingeridos, los pesticidas lipofílicos pueden absorberse en el intestino y pueden ser metabolizados en el hígado antes de entrar en el sistema circulatorio. Los compuestos altamente lipofílicos tienden a concentrarse en tejidos con alto contenido graso, tales como el tejido adiposo, cerebro, hígado riñón y, en el caso de mamíferos, en la leche. La presencia de estos compuestos en tejidos y en leche también está afectada por su grado de biotransformación y su porcentaje de eliminación del cuerpo.

Un problema permanente para la producción e industrialización de alimentos de origen animal es la evaluación y el manejo de los riesgos asociados con bajos niveles de pesticidas en estos alimentos. Para estas situaciones, la información sobre la persistencia y el transporte de estos contaminantes, resultará de suma utilidad (MacLachlan y Bhula, 2008).

En relación a la agricultura, el aumento de la producción de granos registrado en los últimos años en la Argentina no solo se debió a una mayor área sembrada sino también a más altos rendimientos por hectárea, logrados mediante modernas prácticas de manejo como la rotación de cultivos y la siembra directa, entre otros.

En la década de 1970 ingresó al país el trigo de germoplasma mexicano y el cultivo de soja. En esa época, este último constituía un cultivo casi experimental. Hacia la década del 80' comenzó a expandirse y cambió la tenencia de la tierra apareciendo los contratistas y los pooles de siembra, generando así un nuevo proceso de deterioro del suelo (Heredia, 2010). La introducción del cultivo de soja en la Pampa Ondulada marcó un cambio en los modelos de uso agropecuario adoptados hasta entonces, caracterizado por una paulatina disminución de la actividad ganadera en detrimento del doble cultivo trigo-soja (Casas, 2002).

La soja siguió creciendo aumentando en diez años, desde las campañas del 2002/2003 hasta la del 2012/2013, en 16 veces su área sembrada (ha) y en 1,4 (toneladas) su producción en la República Argentina. En la provincia de Buenos Aires el crecimiento fue aún más espectacular durante esos mismos años, ya que aumentó en 2,7 veces el área sembrada y en 2,5 veces la producción (Elaboración propia de datos de la SIIA, 2013).

Conjuntamente con la evolución de la soja, las ventas en el mercado Argentino de fitosanitarios aumentaron del 2010 al 2011 en un 22%, ya que en el 2010 la facturación total fue de 1.676 millones de U\$S y en el 2011 fue de 2.052 millones de U\$S. En el año 2012 las ventas siguieron aumentando hasta cerrar en 2.381 millones de U\$S incrementándose un 16% en relación al año anterior (CASAFE, 2013). En el año 2012 el principal segmento de agroquímicos siguió siendo el de los herbicidas con un 64% de la facturación, que vuelve a tomar la dimensión histórica que supo tener por encima del 60% de las ventas (1997-2009). El segundo segmento en importancia por su facturación es el de los insecticidas que representó un 16% del total del mercado. El Clorpirifos siguió siendo el principal activo del segmento con 61 millones de U\$S. Los piretroides y organoclorados como la cipermetrina y el endosulfán registraron una baja del 18 y 34% en facturación y un 28 y un 42% en volumen respectivamente (CASAFE, 2013).

La soja es el cultivo que aporta al mercado de plaguicidas el mayor porcentaje de ventas en Argentina. Los principales productos vendidos para la soja son, en orden de importancia, los herbicidas, los insecticidas y los fungicidas. La soja aportó, en el año 2011, un 41% (835

millones de U\$S) de un total de 2.052 millones de U\$S en ventas de pesticidas en todo el país. En el 2012 este mismo cultivo aportó un 39% de las ventas en todo el país, siendo de 942 millones de U\$S de un total de 2.381 millones de U\$S. En ese mismo año, siguiendo la misma tendencia que en el 2011, le siguieron en orden de importancia, el maíz con un 12% (276 millones de U\$S), el trigo con 5% (121 millones de U\$S) y el girasol con un 4% (97 millones de U\$S) (CASAFA, 2013).

Para comprender qué cantidad de clorpirifos se está liberando al ambiente en una sola aplicación, podemos hacer el siguiente cálculo: en la provincia de Buenos Aires el área cubierta con soja durante el ciclo 2011/2012 fue de 5.969.357 hectáreas. Considerando que la dosis media de aplicación para el Clorpirifos es de 1 l/ha (0,480 kg/ha; EC 48% p/v), se puede deducir que se han aplicado 2.865.291 kg de este insecticida. Si hacemos el mismo cálculo para todo el país, el valor alcanza los 8.962.050 kilogramos.

1.3. Los plaguicidas en la historia mundial

La sociedad ha venido utilizado insecticidas desde hace miles de años. Las motivaciones principales del uso de estos radicarón por un lado, en el control de enfermedades generadas por insectos o roedores (malaria, fiebre amarilla, peste bubónica, etc.) y por el otro en la prevención del ataque de insectos a los cultivos de alimentos (Baird, 1998).

Mil años antes de la era cristiana, Homero se refería a ciertas prácticas de control o repelencia de insectos con azufre (SO₂) en la antigua Grecia. Se utilizaba la quema de esta sustancia para fumigar las casas griegas contra insectos y hongos, y su uso se extendió hasta el siglo XIX (Baird, 1998; Igarzábal, 2008)

El cianuro de hidrógeno gaseoso también se utilizó como fumigante en el año 1877 en las colecciones de los museos y para el control de insectos en árboles frutales. El fluoruro de sodio (NaF) se utilizó domésticamente para controlar las poblaciones de hormigas y junto con el ácido bórico para combatir cucarachas en edificios infestados. La utilización de arsénico y derivados para controlar insectos data del tiempo de los romanos y fue utilizado por los chinos en el siglo XVI (Baird, 1998).

Ya en la era cristiana empezó a hacerse famoso el arsénico por ciertas cuestiones relacionadas con la sanidad y la alquimia. El arsénico blanco es citado para combatir plagas de

ratones en Alejandría en la época de Atila (400 años DC), y fueron los chinos quienes lo desarrollaron específicamente para controlar las plagas de huertas, jardines y otros cultivos hacia el año 1000. El límite de los siglos XVII y XVIII marca la aparición como insecticida de la nicotina, proveniente del tabaco. Entre 1850 y 1860 se produjo el primer gran hito en la historia de los insecticidas: la aparición del Verde de París (aceto-arsenito de cobre) (Igarzábal, 2008)

En las décadas del 40 y 50, las industrias químicas de América del Norte y de Europa occidental produjeron grandes cantidades de muchos pesticidas, en especial insecticidas, cuyos ingredientes activos en la mayoría de los casos eran compuestos organoclorados (Baird, 1998). El DDT (dicloro-difenil-tricloro-etano) fue sintetizado por un químico alemán en 1874, pero sus propiedades como insecticida se descubrieron en 1936 por Paul Müller un suizo que ganó el premio nobel por su descubrimiento en 1946. El DDT dio origen al comienzo de una nueva era en la utilización de pesticidas (Carson, 2002; Igarzábal, 2008). Rachel Carson, bióloga estadounidense, publicó su “Primavera Silenciosa” en 1962, mostrando las consecuencias del uso del DDT en el ambiente. Este agrotóxico que combatía la enfermedad del Olmo Holandés, afectó la supervivencia de ciertas aves como el águila calva o el petirrojo americano (Baird, 1998).

Los nuevos grupos químicos de insecticidas sintéticos aparecieron en masa luego de la segunda guerra mundial (Carson, 2002; Igarzábal, 2008). En 1944 surgieron los órgano fosforados con el compuesto Bladan (tetraetilpirofosfato), la aletrina inició la industria química de los piretroides en el año 1949 y el carbaril apareció como el primer carbamato insecticida en 1956 (Igarzábal, 2008).

Si bien en 1970 se prohibía la venta del DDT, en muchos países se seguía utilizando. Fue en el año 2001 cuándo se firmó en Estocolmo el Convenio sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) en el que se prohibieron definitivamente el DDT y otros compuestos, que denominaron la “Docena Sucia”. En nuestro país este convenio se ratificó en el año 2004 con la ley 26.011. A pesar de todas las discusiones al respecto, en el año 2006, la Organización Mundial de la Salud (OMS) anunció que volvería a recomendar la utilización de DDT en sus campañas para combatir la malaria, después de haber discontinuado la promoción de su uso a principios de los años 80 (Igarzábal, 2008).

Actualmente la USEPA (United States Environmental Protection Agency) define a los plaguicidas como: “cualquier sustancia o mezcla de sustancias creadas con el fin de prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier peste”

En Argentina la problemática de los agroquímicos y sus envases, así como su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente, fue tratada en la Resolución del MSyA N° 1.221 del año 2004. Esta establece que “Los agroquímicos utilizados en el control de plagas, y los fertilizantes y aditivos destinados a maximizar los rendimientos de cosecha y mejorar la calidad edafológica poseen una marcada incidencia ambiental. Son capaces de producir contaminación en suelos y aguas tanto superficiales como subterráneas, generando riesgo de intoxicación de seres vivos, de lo cual no se encuentra excluido el hombre”

1.4. Clasificación de los plaguicidas

Los productos químicos agrícolas denominados plaguicidas son el grupo más grande de sustancias tóxicas diseminadas intencionalmente en el ambiente. El término plaguicida abarca a una sustancia o mezcla de sustancias destinada a prevenir, destruir, repeler o mitigar alguna plaga, incluyendo a transmisores de enfermedades en humanos y animales, a plantas no deseadas o animales que causen daño durante o interfieran con la producción, procesamiento, almacenaje, transporte o comercio de alimentos (Anguiano y Montagna, 2010)

Sólo un pequeño porcentaje de los productos aplicados para el control de plagas alcanza a los organismos que pretende controlar; el resto de los productos se dispersan en el ambiente y representan un riesgo para los ecosistemas y los organismos no-blanco a los cuales no estaban dirigidos. De esta manera pueden producirse efectos indeseables e incluso irreparables en el ambiente.

Existen diversos criterios a la hora de clasificar los plaguicidas. La más común toma como criterio de clasificación la plaga a la cual el compuesto controla (Tabla 1.1.).

Tabla 1.1. Diferentes tipos de compuestos pesticidas según la plaga que controlan.

(Fuente: es.slideshare.net/adnestelamartin/plaguicidas-2703-14?qid=3090661c-cf4e-4605-b302-acd55ad5817b&v=qf1&b=&from_search=1)

INSECTICIDAS	Minerales	Compuestos arsenicales Compuestos fluorados Azufre Derivados del selenio
	Orgánicos	Organofosforados Organoclorados Carbamatos
	A base de aceites minerales	Aceites antracénicos Aceites de petróleo
	De origen vegetal	Nicotina Piretrinas (con y sin grupo ciano) Rotenona
HERBICIDAS	Minerales	Sales de NH_4^+ , Ca^{++} , Cu^{++} , Fe^{+++} , Mg^{++} , K^+ , Na^+ , en forma de sulfatos, nitratos, cloruros, cloratos.
	Orgánicos	Fito hormonas Derivados de la urea Triazinas y Diazinas Derivados de los fenil sustituidos y las quinoxalinas Derivados de la oxiquinoleína Derivados de las tiadizinas y tiadiazoles
	Otros	Paraquat Diquat Piclorame
FUNGICIDAS	Minerales	Sales de cobre Compuestos arsenicales Aceites minerales
	Órgano-metálicos	Derivados órgano-mercuriales
	Orgánicos	Carbamatos y ditiocarbamatos Derivados del benceno Amicidas Benzonitrilos
RODENTICIDAS	Derivados cumarínicos	Warfarinas Sales de talio
	Inorgánicos	

1.5. Principales grupos de insecticidas

Un insecticida, es un producto fitosanitario utilizado para controlar insectos afectando su sistema vital. Cada uno de ellos actúa de manera diferencial sobre los organismos. La interacción entre el insecticida y el órgano blanco, puede darse de diferentes maneras. Se denominan de ingestión a aquellos que los insectos incorporan a través de las plantas que han consumido; de contacto, por acción del insecticida directamente sobre el organismo blanco; combinados, que es la acción sinérgica de los dos anteriores; sistémico, que hace contacto directo con el organismo blanco, y es traslocado dentro del cuerpo del insecto y ejerce su efecto de diversas maneras (CASAFA, 2011).

Organofosforados

Se denomina de esta forma a todos los compuestos que poseen un grupo o derivado fosfato como parte de la molécula, en general del ácido fosfórico e inhiben irreversiblemente a la enzima colinesterasa, siendo neurotóxicos (Figura 1.1) (CASAFA, 2011). Según se reemplacen los distintos sustituyentes, se van construyendo los distintos tipos de insecticidas organofosforados, que son ortofosfatos, tiofosfatos, ditiofosfatos, fosfonatos, etc. Algunos ejemplos son los insecticidas clorfenvinfos (ortofosfato), clorpirifos (tiofosfato), malation (ditiofosfato) y triclorfon (fosfonato).

En comparación con los compuestos organoclorados, se descomponen con mayor facilidad y son menos persistentes en el ambiente. Su grado de toxicidad depende del compuesto del cual se trate. Los más peligrosos de todos los compuestos organofosforados son los que poseen enlaces $P=O$ (oxofosforados), ya que son fuertemente inhibidores de la AChE. Los tiofosforados ($P=S$) necesitan de una biotransformación a la forma oxo para actuar como inhibidores. La activación ocurre a través de un proceso de desulfuración oxidativa mediado por el sistema enzimático de las oxidasas de función mixta (OFM) (Hyne y Maher, 2003).

Son muy peligrosos para la salud humana, la biota acuática, las aves y las abejas. Ingresan al organismo por vía dérmica, respiratoria, digestiva y conjuntiva. Cuando el ingrediente activo se disuelve en solvente orgánico, se facilita la absorción del producto a

través de la piel. Su biotransformación se hace mediante enzimas oxidasas, hidrolasas y transferasas, principalmente hepáticas (Peña *et al.*, 2001; Sotomayor, 2011).

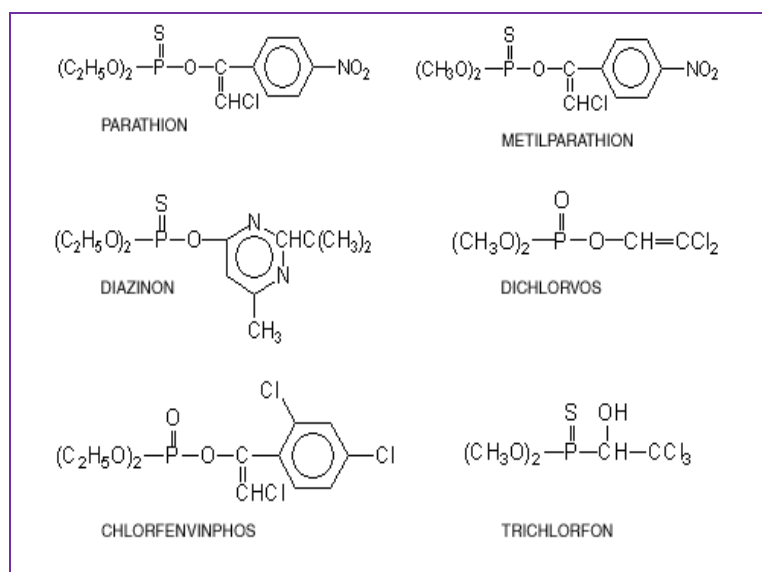


Figura 1.1 Se observan algunos ejemplos de compuestos organofosforados.

(Fuente: es.slideshare.net/adnestelamartin/plaguicidas-2703-14?qid=3090661c-cf4e-4605-b302-acd55ad5817b&v=1&b=&from_search=1)

Organoclorados

Son compuestos aril, carbocíclicos o heterocíclicos que llevan cloro en su estructura química (Figura 1.2). Son los primeros insecticidas de síntesis que se utilizaron en la historia. Interfieren en la transmisión axónica de los impulsos nerviosos, poseen baja presión de vapor, alta estabilidad química y persistencia en el medio ambiente. Por otra parte, resisten el ataque de los microorganismos y tienden a acumularse en el suelo, se transportan por aire adheridos a material particulado, son poco solubles en agua pero con una elevada afinidad a los solventes orgánicos y lípidos, lo que genera acumulación en el tejido graso de los organismos bioacumulándose y/o biomagnificándose (Gray, 2002).

Estos compuestos al excretarse por vía biliar pueden ser absorbidos a nivel intestinal, posibilitando una vida biológica mayor y efectos a largo plazo. Pueden ingresar al organismo por ingestión, inhalación o por contacto con la piel. La penetración dérmica de los plaguicidas organoclorados varía ampliamente, desde el DDT que es poco absorbido por la piel intacta aun en solución aceitosa, hasta aquellos como endrin, aldrin, dieldrin y heptacloro, que penetran con mayor facilidad y proporción. Los efectos tóxicos se observan con mayor rapidez si son ingeridos, que por exposición dérmica o inhalación.

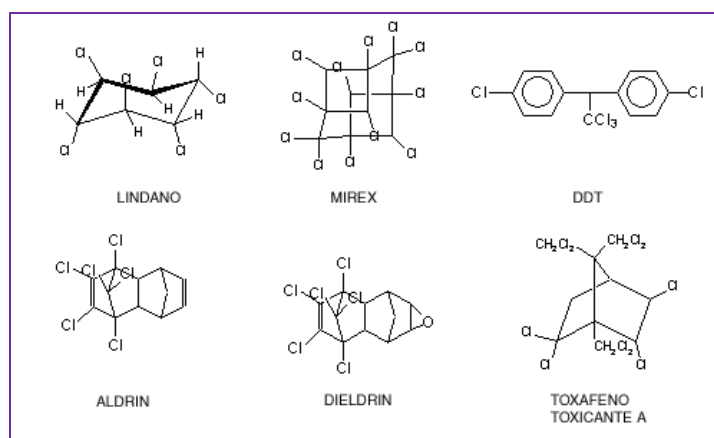


Figura 1.2. Se observan algunos ejemplos de compuestos organoclorados.

(Fuente: es.slideshare.net/adnestelamartin/plaguicidas-2703-14?qid=3090661c-cf4e-4605-b302-acd55ad5817b&v=qf1&b=&from_search=1)

Carbamatos

Todos estos productos derivan del ácido carbámico, de fórmula HO-CO-NH_2 . Podemos distinguir tres grandes grupos: los Aril-N-metilcarbamatos (Carbaril), los carbamatos heterocíclicos (Carbofurano) y las oximas (Aldicarb y methomyl) (Fukuto, 1990).

Luego de los organoclorados y los organofosforados la síntesis de insecticidas evolucionó hacia productos como los carbamatos con diferentes funciones, como por ejemplo los ditiocarbamatos que son fungicidas, los fenilcarbamatos que son herbicidas, y los metilcarbamatos que son insecticidas (CASAFA, 2011) (Figura 1.3). Estos compuestos inhiben

la colinesterasa de modo similar a como lo realizan los insecticidas organofosforados (Fukuto, 1990). Los formulados comerciales más comunes son el Baygon, el Servin, el Temik y el Zactram. Su persistencia en el ambiente y su toxicidad, es intermedia entre los dos anteriores.

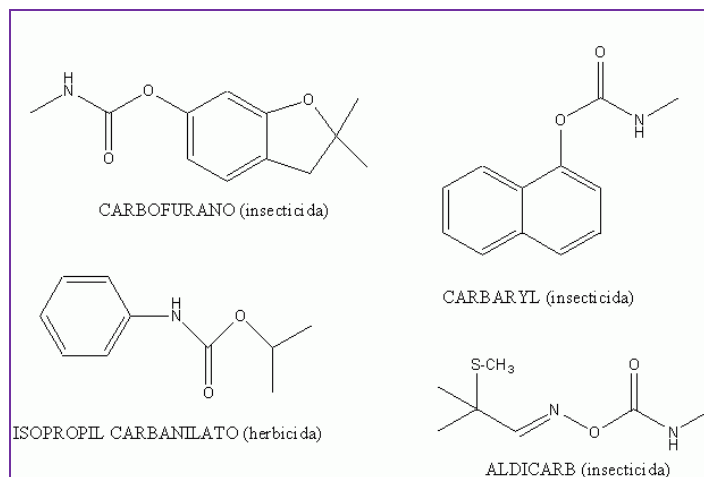


Figura 1.3. Se observan algunos ejemplos de compuestos carbamatos.

(Fuente: <http://www.ugr.es/~quiorred/qoamb/Carbamatos.gif>)

Piretroides

Son extractos oleoresinosos de flores de crisantemo disecadas (*Chrysanthemum cinaerifolium*). Son sintetizados químicamente y similares a las piretrinas naturales, pero son fotoestables, no se descomponen tan fácilmente como las piretrinas (naturales) y aletrinas (sintéticas) (Cisneros, 1995; CASAFE, 2011).

El modo de acción de los piretroides se debe a que causan una prolongación de la apertura de los canales de sodio neuronales dependientes de voltaje, lo que resulta en una transmisión continua del impulso nervioso (Stenersen, 2004).

En general, son productos con amplio espectro de acción, notoriamente sin efecto acaricida (salvo alguna excepción); no hay productos sistémicos, su acción es por contacto con efectos paralizantes. La mayoría es poco tóxica para el hombre y otros animales de sangre

caliente por lo que su uso se ha extendido contra plagas caseras y de salud pública (Cisneros, 1995).

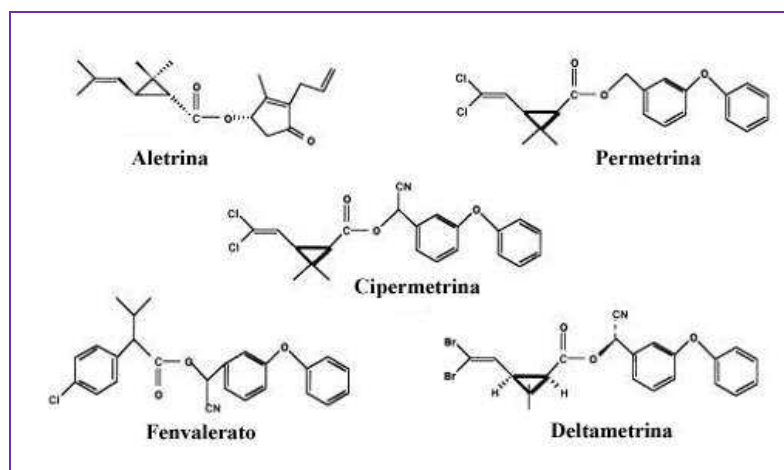


Figura 1.4. Se observan algunos ejemplos de piretroides.
(Fuente: <http://www.ropana.cl/toxivet/Insecticidas%20piretroides.htm>)

Principales herbicidas de Argentina

Los más vendidos en Argentina son el glifosato y la atrazina (Figura 1.5)

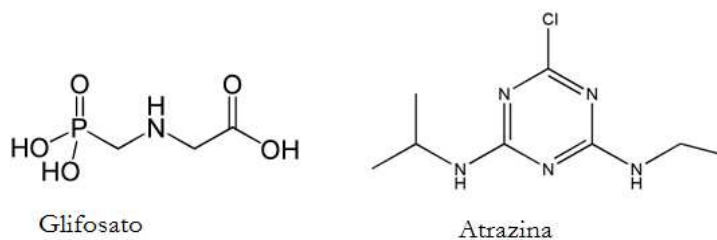


Figura 1.5. Estructuras de los dos herbicidas más vendidos de Argentina.

El **glifosato** (N-(fosfometil) glicina) es un análogo aminofosforado del aminoácido natural glicina (Carriquiriborde, 2010). Su modo de acción como herbicida es a través de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintetasa (EPSPS), que se encuentra implicada en la síntesis de los aminoácidos aromáticos: tirosina, triptófano y fenilalanina (Schönbrunn *et al.*, 2001). El glifosato es un herbicida post emergente, sistémico y de amplio espectro utilizado en agricultura, horticultura, silvicultura e incluso uso domestico en jardinería. Está especialmente diseñado para el control de malezas en cultivos genéticamente modificados que poseen una versión de la EPSPS resistente a la inhibición por glifosato (Carriquiriborde, 2010).

La **atrazina** es un derivado de la triazina, inhibidor de la fotosíntesis y selectivo para especies latifoliadas y gramíneas. Generalmente es aplicado al suelo aunque también puede ser eficaz en aplicaciones sobre el follaje. Una vez incorporado al suelo, se absorbe por las raíces y se trasloca hacia las hojas y demás órganos verdes donde actúa (Papa, 2007). Atrazina es uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial para el control de malezas. En nuestro país se aplica en forma extensiva en el cultivo de maíz para el control de malezas, principalmente latifoliadas y de algunas gramíneas.

1.6. Insecticida clorpirifos

1.6.1 Características físico-químicas

El clorpirifos (*O,O*-dietil-*O*-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato), cuya fórmula molecular es $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ (Figura 1.6) es un insecticida/acaricida organofosforado de aplicación foliar y edáfica utilizado en el control de insectos (masticadores y chupadores) y ácaros. Es principalmente producido desde el año 1966 por Dow Elanco antes conocida como Dow Chemical Co.

En el campo su formulado comercial es utilizado en diversos cultivos como: la soja, el trigo, el maíz, el algodón, la alfalfa, el girasol, el sorgo, la papa, el tabaco, el ajo, los cítricos, los cereales de invierno, etc. (CASAFE, 2011).

El clorpirifos posee cloro en su estructura, y por ello la persistencia de este en el ambiente puede ser mayor en comparación con otros compuestos organofosforados. Por su

estructura química se lo señala como un tóxico peligroso para la salud de los ecosistemas y para la salud humana. También se usa en clínica veterinaria y a nivel doméstico. Como se mencionó anteriormente, en Argentina es actualmente uno de los top 10 más vendidos y el primero dentro del bloque de los insecticidas (CASAFE, 2013).

Se lo aplica previo y/o durante la siembra, cuando aparecen los primeros focos de ataque en brotes o durante la floración. Actúa por contacto, ingestión y/o inhalación. Algunos de sus nombres comunes son: Lorsban, Dursban, Boraz, Bester, shooter, terminator, Dowco 179, Empire, Equity, Eradex, Lentrek, Lock-On, Terfos, etc. (CASAFE, 2011). Actualmente existen 312 productos registrados que poseen clorpirifos (Turner, 2003). En la tabla 1.2 se observan las principales características físico-químicas del clorpirifos.

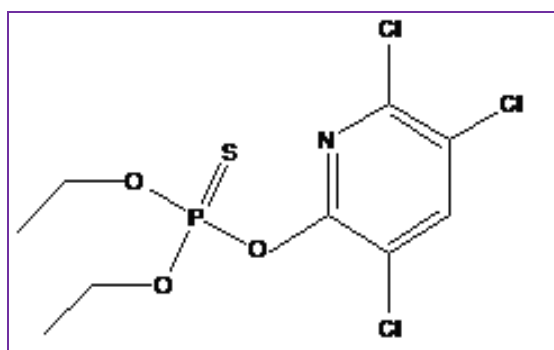


Figura 1.6. Estructura del clorpirifos (Alvarez *et al.*, 2013)

Tabla 1.2. Propiedades físico-químicas del clorpirifos (Adaptado de Watts, 2012).

Propiedad	Valor	Referencia
Peso molecular	350,6	EFSA (2005)
Densidad (46 °C)	1,38 g/cm ³	APVMA (2000)
Temperatura de descomposición	Se descompone antes de hervir a 170-180 °C	EFSA (2005)
Presión de vapor	2,546 x 10 ⁻³ Pa (1,91 x 10 ⁻⁵ mm Hg) a 25°C (99,8 % pureza) 3,35 x 10 ⁻³ Pa a 25°C (99,8 %)	WHO (2009) EFSA (2005)
Solubilidad en agua	0,941 mg/l a 20°C 2 mg/l a 25 °C	WHO (2009) ATSDR (1997)

K _{ow} (coeficiente de partición octanol/agua)	Log K _{ow} = 5 a 24,5 °C (98%) Log K _{ow} = 4,7 a 20 °C (>98%)(pH=7) Log K _{ow} = 4,96 - 5,11 (20°C) Log K _{ow} = 5,2 - 5,267 (25°C)	WHO (2009) WHO (2009); EFSA (2005) Gebremariam <i>et al.</i> (2012)
Coeficiente de adsorción K _{oc}	40-500 l/kg (sedimentos acuáticos) 3606 - 5983 l/kg (suelos y sedimentos) 6070 ml/g	Gebremariam <i>et al.</i> (2012)
Punto de ebullición	> 400°C	FAO (2006)
Punto de fusión	41 a 43,2°C	FAO (2006)
Temperatura de descomposición	201 a 390 °C	FAO (2006)
Fotólisis en agua (tiempo de vida media)	39,9 días (ríos bajo luz natural)	EFSA (2005)
Tiempo de vida media en agua dulce (hidrólisis)	Tiempo de vida ½ a 25°C pH 4,7-5 de 63 a 75 días pH 6,9-7 de 16-35 días PH 8,1 de 23 días	EFSA (2005)
Tiempo de vida media en suelos	74 (43-111) días a 20 °C y aerobiosis (laboratorio) 1,3-120 días (campo)	EFSA (2005)
Tiempo de vida media en sedimentos	223 días (anaerobiosis) 20,3 días (aerobiosis)	Bondarenko y Gan (2004)
Tiempo de vida media en todo el sistema (agua y sedimentos)	22-51 días	EFSA (2005)

1.6.2 Principales productos de degradación del clorpirifos

Los procesos de degradación del clorpirifos más importantes son la hidrólisis y la oxidación. La hidrólisis puede ser tanto química como bioquímica; en esta última intervienen enzimas fosfatasa, siendo el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) el producto principal (Giesy *et al.*, 1999) (Figura 1.7). La EFSA (2005) informa que la vida media del TCP en suelos (20 °C y aerobiosis) es de 10 a 96 días y la USEPA (2006) lo describe cómo un compuesto móvil, en dicha matriz, pero muy persistente cuando no se lo expone a la luz, observándose cantidades apreciables del producto 365 días después de su aplicación. La solubilidad en agua del TCP a

20 °C es de 80,9 mg/l, considerablemente más alta que el compuesto original y su log K_{ow} de 3,21 a 20 °C y pH 7 (PPDB, 2014).

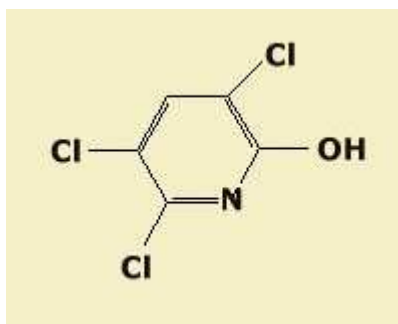


Figura 1.7. Estructura del TCP (PPDB, 2012)

Sardar y Kole (2005) establecieron que el TCP se detectó a partir del tercer día de la aplicación de clorpirifos en suelos del Ganges, y que éste mantuvo su máxima concentración hasta el día 30 para luego disminuir progresivamente en el día 120. La misma disminución se observó con el metabolito secundario 3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina (TMP).

El TCP exhibe un coeficiente de partición suelo/agua mucho más bajo que el clorpirifos, y en consecuencia, grandes cantidades de éste están disponibles para ser acarreados por las lluvias por mucho más tiempo (NMFS, 2008). Las concentraciones de éste en el agua y sedimento son comparables, y por ello el escurrimiento se produce principalmente por disolución en el agua de escorrentía en lugar de por adsorción a las partículas del suelo (USEPA, 2006). Ésta última característica señala al TCP como un posible contaminante de las aguas subterráneas, además de las superficiales.

Hay poca información disponible sobre el resto de los otros metabolitos. En la tabla 1.3 se observan los principales productos de degradación del clorpirifos.

Tabla 1.3. Productos de degradación del clorpirifos (Adaptado de Watts, 2012).

Metabolitos tóxicamente relevantes	Importancia de los metabolitos	Referencia
3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP)	Primario	EFSA (2005); USEPA (2009)
3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina (TMP)	Secundario (<10%)	USEPA (2011)

Clorpirifos-oxon	En general minoritario, pero se lo considera de importancia en agua	USEPA (2009, 2011)

Los valores de toxicidad aguda para las aves, mamíferos, peces e invertebrados de agua dulce, marina y estuariales, indican que el TCP no es tóxico, en cambio el clorpirifos-oxon es 12 veces más tóxico que el clorpirifos y se lo ha encontrado en muestras de aguas superficiales, en agua de bebida, lluvia y de aire. La oxidación del clorpirifos a clorpirifos-oxon puede ocurrir mediante fotólisis, metabolismo aeróbico y cloración del agua, así como también por otros procesos oxidativos. La forma oxon es más soluble en agua, sufre hidrólisis más rápidamente que el clorpirifos y se transforma en TCP (USEPA, 2009; 2011).

1.6.3. Evidencias de bioconcentración y efectos del clorpirifos sobre las comunidades acuáticas

A través de la lixiviación y la escorrentía, los sistemas de agua tienden a acumular productos químicos en toda la cuenca, y estos compuestos hidrofóbicos tienden a unirse a sustancias orgánicas o al material particulado (incluidos los organismos vivos) (Cornelissen *et al.*, 2005). El clorpirifos posee un alto coeficiente de partición octanol-agua, $\log K_{ow}$ es de 4,7 a 5,11 (Watts, 2012; Giesy *et al.*, 2014), y esto es de suma importancia debido a que es más propenso a biomagnificarse a través de la cadena alimenticia acuática y a su vez puede dañar especialmente a organismos que se hallan en la base de la misma, como camarones y otros crustáceos (Noble, 1993). Hay una preocupación mundial acerca de las posibilidades de biomagnificación de este compuesto, ya que se ha encontrado en ciertas regiones del Ártico. Los criterios de bioacumulación del Convenio de Estocolmo establecen que si el K_{ow} es de 5 entonces hay riesgo (Watts, 2012). La Unión Europea ha categorizado al clorpirifos como un tóxico de nivel 1 “muy tóxico para la biota acuática con efectos nocivos duraderos”.

La USEPA y la Unión Europea, consideran que el clorpirifos posee una alta toxicidad aguda y crónica para los peces e invertebrados acuáticos. La USEPA recomienda niveles de 0,0414 µg/l como criterio de calidad de agua para las etapas más sensibles de los ciclos de

vida de ciertos organismos de agua dulce y con exposición crónica a este pesticida (USEPA, 1991; 2002). Canadá admite una concentración de clorpirifos en agua, aún menor, de 0,0035 µg/l (CCME, 1999). En Argentina el nivel guía establecido por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (2005) es $\leq 0,006$ µg/l. Los peces e invertebrados de agua dulce y marina han demostrado ser en su mayoría afectados por un alto grado de toxicidad, en este sentido hay numerosos estudios que lo demuestran (Varo *et al.*, 2002; De Silva y Samayawardhena, 2005; Cáceres *et al.*, 2007; Reinecke y Reinecke, 2007; Jantunen *et al.*, 2008; Mehler *et al.*, 2008; Bollmohr *et al.*, 2009; Eddins *et al.*, 2010). La exposición de estos organismos a concentraciones subletales de clorpirifos ha provocado los siguientes efectos: incoordinación motora, retraso en la maduración, deterioro del crecimiento y de la reproducción, cambios comportamentales y neurológicos, deformidades y descenso en los números poblacionales. Es considerado como genotóxico, inmunotóxico, embriotóxico, teratogénico, neurotóxico y un disruptor endócrino (NMFS, 2008; Watts, 2012).

Se define al Factor de Bioconcentración (FBC) como la relación entre la concentración del contaminante en el organismo (µg/kg peso húmedo) y la concentración del contaminante en el agua (µg/l) en condiciones estáticas (OECD, 1995; ECB, 2003). Es la acumulación neta de un contaminante en y sobre un organismo a partir exclusivamente del agua. En el estado estacionario, que se presenta cuándo la concentración del compuesto es constante en el tiempo y resulta de los procesos de captación y eliminación, el Factor de Bioconcentración está determinado por la partición del compuesto entre el agua y los componentes hidrofóbicos del organismo. Éste factor está en estrecha relación con las características químicas del contaminante en cuestión. En el caso de compuestos no polares (no solubles en agua), con elevada lipofilidad (solubles en grasas), el compuesto tiende a permanecer en el organismo; si el organismo no puede metabolizarlo y eliminarlo, tiende a bioacumularse. En cambio, el Factor de Bioacumulación es la relación entre la concentración del contaminante en el organismo y la concentración del contaminante en todas las fuentes potenciales (agua y alimento) (Figura 1.8). Turner (2003) considera que la principal vía de entrada de los productos químicos, en peces e invertebrados, se da a través de las branquias.

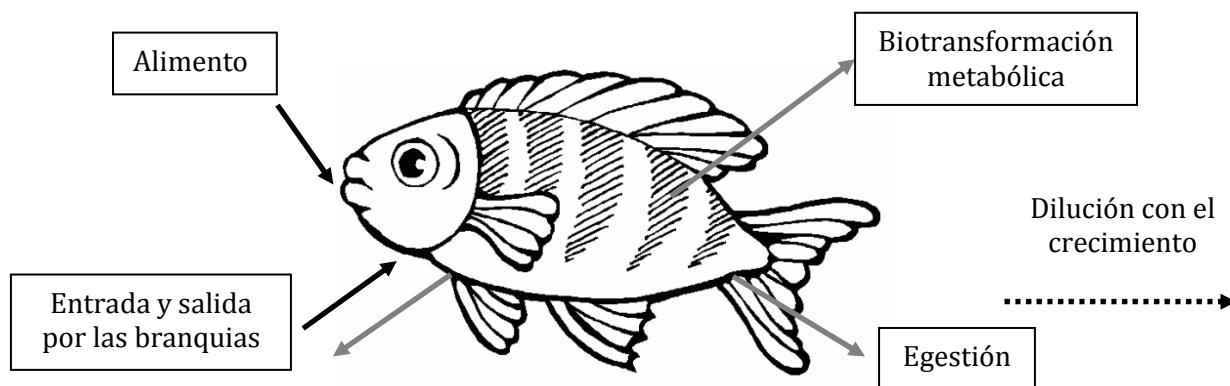


Figura 1.8. Principales rutas de entrada y eliminación de compuestos tóxicos en peces
(Adaptado de Arnot y Gobas, 2006).

Se han informado valores de FBC para el clorpirifos que van desde los 100 hasta los 5.100 en organismos acuáticos (Racke, 1993; USEPA, 1986), superando en muchos casos el valor umbral de 2.000 y 5.000 (tabla 1.4). El grado en que éste insecticida se bioconcentra en los organismos depende de la duración de la exposición, de la dosis de aplicación, de las características fisiológicas, bioquímicas y genéticas de los organismos, de la tasa metabólica, de la tasa de depuración y de la biodisponibilidad del clorpirifos en el medio y en los alimentos (Eisler, 2000). Los valores del FBC para el clorpirifos indican bioconcentraciones en peces que van desde moderadas a altas, indicando una incorrecta metabolización del compuesto en estos organismos, además de un riesgo considerable para su supervivencia (Francke *et al.*, 1994). Además del FBC existen otras características que hacen que los pesticidas tiendan a bioacumularse, como el K_{ow} cuándo es mayor a 5 y el peso molecular cuándo es menor a 1.000 (OECD, 1995; Watts, 2012; Giesy *et al.*, 2014).

Tabla 1.4. Valores umbrales de Kow y FBC (factor de bioconcentración) establecidos por los principales entes de regulación ambiental en relación al riesgo de acumulación por organismos acuáticos (Adaptado de Arnot y Gobas, 2006).

Agencia de regulación	Valor umbral (valor log)	Programa
Environmental Canada	Kow \geq 100.000 (5) FBC \geq 5.000 (3,7)	Canadian Environmental Protection Act, 1999 (CEPA, 1999)
European Union	“Bioacumulativo” FBC \geq 2.000 (3,3) “Muy bioacumulativo” FBC \geq 5.000 (3,7)	Registration, Evaluation and authorizations of chemicals (REACH)-Annex XII- European Commission 2001
United States	“Bioacumulativo” 5.000 (3,7) \geq FBC \geq 1.000 (3)- “Muy bioacumulativo” FBC \geq 5.000 (3,7)	Toxic Substances Control Act (TSCA); Toxic Release Inventory (TRI) USEPA (1976)
United Nations Environment Programme	Kow \geq 100.000 (5) FBC \geq 5.000 (3,7)	Convenio de Estocolmo de compuestos orgánicos persistentes (UNEP, 2001: Giesy <i>et al.</i> , 2014)

Se han informado los FBC en numerosas especies de peces, invertebrados y plantas (USEPA, 1986; Odenkirchen y Eisler, 1988; Giesy *et al.*, 2014). Algunos ejemplos de FBC son el del pez *Opsanus beta* (pez sapo del golfo) en el que se observó que el Factor de Bioconcentración aumentaba de 100 a 5.100 cuándo las concentraciones de clorpirifos se incrementaban desde 1,4 hasta 150 $\mu\text{g/l}$ (USEPA, 1986), así como en la especie *Pimephales promelas* que se registraron valores de FBC cercanos a 1.700 y efectos adversos como deformidades cuándo las concentraciones en el agua fueron de 2,68 $\mu\text{g/l}$ (Jarvinen *et al.*, 1983).

Otros factores de bioconcentración medidos incluyen valores de 1.400 en ostras (Woodburn *et al.*, 2003), 400 en el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) (Serrano *et al.*, 1997) y de 1.600 en el anfípodo *Gammarus pulex* de agua dulce. Por otra parte, existen numerosos reportes de bioconcentración en algas verde azuladas (Lal *et al.*, 1987), en plantas

acuáticas como *Lemna minor* cuyo FCB fue de 5.700 (Giesy *et al.*, 2014) y en el pez mosquito (Metcalf, 1974), entre otros.

1.6.4. Evidencias de toxicidad del clorpirifos en Argentina sobre invertebrados acuáticos

En Argentina existen numerosos estudios que evidencian la presencia de clorpirifos y sus efectos tóxicos sobre las comunidades acuáticas. Ejemplos de éstos son los trabajos de Marino y Ronco (2005) que determinaron la ocurrencia de clorpirifos en varios ríos pampásicos; Jergentz *et al.* (2004a,b; 2005) informaron pulsos de toxicidad en arroyos cercanos a zonas de cultivo intensivo; Mugni *et al.* (2011) llevaron a cabo estudios con *H. curvispina* y observaron que mortalidades de 6% y 30% estaban asociadas a concentraciones de 0,014 y 0,044 µg/l de clorpirifos en agua. En todos los casos, se relacionaron los pulsos de toxicidad con las aplicaciones de éste pesticida en los cultivos adyacentes.

Mugni *et al.* (2012) realizó experiencias con las especies *Hyaella curvispina* y el pez *Cnesterodon decemmaculatus* simulando varios procesos de escorrentía para tres aplicaciones del producto con las dosis recomendadas por los productores de la zona: 2 l/ha del formulado comercial Terfos (48 g de clorpirifos en 100 ml). En la primera simulación de escorrentía el clorpirifos se redujo de 0,35 µg/l, inmediatamente luego de la aplicación, hasta 0,06 µg/l, 19 días después. Observaron que la mortalidad de la especie *H. curvispina* se prolongaba hasta los 28 días y que a los 19 días todavía era del 100%. La LC50 fue estimada en 23 días. En relación a la toxicidad del sedimento, para la especie *H. curvispina*, ésta cesó a los 42 días de la primera aplicación. El LC50 para los sedimentos se estimó en 58,6 días. En la segunda aplicación, la concentración de clorpirifos inmediatamente después, fue de 3,6 µg/l y fue indetectable a las dos semanas. La toxicidad del agua para *H. curvispina* cesó a los 23 días y el LC50 estimado fue de $17,4 \pm 0,12$ µg/l. En el caso del sedimento, la toxicidad observada para dicha especie se extendió hasta los 21 días después de la segunda aplicación y el LC50 fue de $13,1 \pm 0,5$ días. Luego de la tercera simulación los autores comprobaron que la toxicidad para el camarón se mantuvo en un 100% hasta el quinto evento de escorrentía, 42 días después de esa última aplicación. Hasta los 140 días la mortalidad se mantuvo en un 30% y el LC50 estimado fue de $92,8 \pm 8,4$ días. En el sedimento la mortalidad fue absoluta hasta los 84 días, disminuyendo a

un 80% luego de 140 días. Las experiencias con la especie *C. decemmaculatus* evidenciaron una mortalidad del 47% luego de la primera aplicación, que cesó seis días después de la segunda aplicación. En el caso de la tercera aplicación, la toxicidad desapareció luego de los 42 días. Estos autores lograron demostrar a través de este estudio, que la toxicidad del clorpirifos depende de la cantidad de veces que se lo aplica sobre los cultivos, y que su persistencia está asociada a las variables ambientales existentes durante las aplicaciones. Otros autores han hallado para alevinos de 15 días de la especie *Cnesterodon decemmaculatus* que la LC50-24h es de 300 µg/l y la LC50-96h es de 75 µg/l (Carriquiriborde, 2010).

Montagna *et al.* (2008) analizaron el consumo de oxígeno en el cangrejo *Trichodactylus borellianus* como una medida de la capacidad respiratoria, y estimaron la tasa metabólica de la especie. También registraron la tasa de excreción de nitrógeno, principalmente amonio, relacionando así las vías respiratorias y la utilización de recursos (carbohidratos y lípidos) con la desaminación de los aminoácidos. La relación entre el consumo de oxígeno y la excreción de nitrógeno (O:N) es un buen indicador de cambios metabólicos y del monto de energía disponible. Esta relación permite reconocer las demandas de un organismo ante determinadas condiciones ambientales como la presencia de pesticidas. La presencia de contaminantes en los cuerpos de agua, cambian la actividad normal de los decápodos (actividad trófica, reproducción), lo que a su vez podría alterar su densidad poblacional. *T. borellianus* es un componente de la dieta de especies de importancia ecológica y económica de aves, peces y mamíferos. Estos autores comprobaron que el clorpirifos al aumentar su concentración incrementaba la tasa de excreción y el metabolismo del amonio. También observaron diferencias con los controles en cuanto a la locomoción, ya que inicialmente mostraban movimientos constantes como caminar, nado errático y saltó hacia atrás y luego de las 3 hrs las actividades disminuyeron en todos los animales evaluados. Los autores atribuyen el aumento de la tasa de excreción, al catabolismo de aminoácidos u otros compuestos que poseen nitrógeno, o bien a la síntesis de polipéptidos. El uso de las proteínas como combustible es indicativo de stress, al igual que el menor consumo de oxígeno, y el clorpirifos mostró un marcado descenso de la relación O:N. Por otra parte, evidenciaron un 100% de mortalidad a una concentración de clorpirifos de 300 µg/l.

1.6.5. Efectos sobre los seres humanos

Este insecticida está clasificado como un plaguicida de clase II, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), moderadamente peligroso. Sin embargo, es la principal fuente de envenenamiento agudo en EE.UU de acuerdo a la EPA. La USEPA (2009) señala que hubo 126 incidentes agudos reportados entre 2002 y 2009, involucrando clorpirifos, con más de 150 personas afectadas de las cuales 17 eran niños.

Existen numerosas revisiones bibliográficas (Cox, 1994; USEPA, 2001; Zhao *et al.*, 2006; Watts, 2012; USEPA, 2013) que evidencian que el clorpirifos es genotóxico, mutagénico, carcinogénico e inmunogénico en seres humanos. Se sabe que además es un disruptor endócrino (efectos estrogénicos, endócrinos y en la tiroides), y que genera toxicidad reproductiva y neurotoxicidad en el desarrollo. El Clorpirifos causa la inhibición de la acetilcolinesterasa, estimulando el sistema nervioso en exceso, provocando náuseas, mareos y confusión. Con exposiciones muy altas (por ejemplo, accidentes o derrames importantes), puede generar parálisis respiratoria y muerte (USEPA, 2006).

Existen numerosas evidencias de residuos de clorpirifos en alimentos. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), recoge datos sobre residuos de plaguicidas en los alimentos y compila un informe anual de los resultados. El resumen anual de 2007 reportó que de las 4.168 muestras en frutas y vegetales, el clorpirifos se detectaba en 394 de estas muestras (USDA, 2007). Singh y Singh (2008) analizaron la concentración de clorpirifos en la sangre de diferentes grupos animales. En seres humanos obtuvieron valores de 0,04 ppm. Los autores consideraron que la concentración de clorpirifos en la sangre del hombre se debió a la exposición de alimentos contaminados por este insecticida. La existencia de compuestos organofosforados en sangre puede ocasionar disminución de la movilidad de los espermatozoides (Traina *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2001; Hauser *et al.*, 2005).

Actualmente se está revisando su toxicidad y persistencia y se pretende que sea incluido dentro del convenio de Estocolmo como compuesto orgánico persistente. Uno de los factores principales por el cual se busca que sea prohibido, es porque se lo ha venido encontrando en el Ártico desde 1971 en el hielo, la nieve, la niebla, el aire, el agua de mar, los sedimentos del lago, los peces y la vegetación, a niveles significativos. Debido a esto algunos científicos consideran que este compuesto podría tener efectos perjudiciales para la biota, especialmente

sobre los organismos acuáticos, debido a que muchos de ellos se encuentran en los niveles más altos de la cadena trófica (Watts, 2012). Por otra parte, se han producido una serie de cambios en los registros del clorpirifos, uno de ellos es la eliminación de todo uso doméstico, con excepción de cebos para hormigas y cucarachas, siempre y cuando no exista ningún tipo de exposición ambiental. Tampoco está permitido su uso como termiticida, salvo en las formulaciones de 0,5% para personas registradas que demuestren que su uso es eficaz (Turner, 2003).

Loewy *et al.* (2011) realizaron una evaluación de la migración de residuos de plaguicidas en aguas superficiales y subterráneas poco profundas en el valle del río Neuquén, Argentina. Los resultados mostraron que las frecuencias de detección más altas en aguas (superficial y subterránea) se encontraron para el metil-azinfos y para el clorpirifos (> 70 %).

1.7. HIPÓTESIS

La contaminación que produzca el clorpirifos en los suelos y los cuerpos de agua estará directamente relacionada con los fenómenos que gobiernen su transporte y determinen su destino final. Los cuerpos de agua superficial del partido de Tres Arroyos se hallan contaminados por pesticidas debido a la aplicación de éstos en zonas agrícolas aledañas. Estos productos alcanzan dichos arroyos por escorrentía y otros fenómenos de transporte de menor importancia (viento, aire, etc.) impactando en los ecosistemas acuáticos y en la biota no blanco.

1.8. OBJETIVOS

1.8.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar una evaluación integral del insecticida clorpirifos en zonas aledañas al arroyo Claromecó y a los tres arroyos circundantes a la localidad de Tres Arroyos, Provincia de Buenos Aires. Llevar a cabo estudios en el laboratorio (comportamiento en matrices sólidas, tiempo de vida media, estudios de ecotoxicidad, evaluación de riesgo, etc.) que aporten elementos para la comprensión de su comportamiento ambiental. Al mismo tiempo analizar las características de los cuerpos de agua superficiales (físico-químicas, concentración estacional de nutrientes) que contribuyan a correlacionar los resultados obtenidos con las prácticas agropecuarias de la zona.

1.8.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Estudiar la interacción y persistencia del pesticida puro y comercial en suelos con diferentes características (contenido de materia orgánica, granulométricas, etc.)

- ✓ Analizar la presencia de nutrientes (nitratos y fosfatos) en diferentes cuerpos de agua del partido de Tres Arroyos y relacionar los resultados con el uso de la tierra y con las aplicaciones de productos fitosanitarios.
- ✓ Analizar la presencia del Clorpirifos como microcontaminante en agua, sedimentos y biota y relacionar los resultados con la intensidad del uso de la tierra y con las prácticas agropecuarias de la zona.
- ✓ Estudiar la posible contaminación de cuerpos de agua superficial de la localidad de Tres Arroyos, utilizando larvas de *Rhinella arenarum* Hensel como organismo bioindicador a través de biomarcadores bioquímicos.
- ✓ Realizar un análisis de riesgo ecológico del insecticida clorpirifos en los ambientes acuáticos de Tres Arroyos y Claromecó

1.9. REFERENCIAS

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1997) Toxicological profile for chlorpyrifos. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service.
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp84.pdf>

Alvarez M., Du Mortier C., Fernández Cirelli A. (2013) Behavior of Insecticide Chlorpyrifos on Soils and Sediments with Different Organic Matter Content from Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Water Air Soil Pollut*, 224:1453.

Anguiano O.L., Montagna C.M. (2010) Clasificación y Toxicología de plaguicidas. Editorial Educo, pp: 53-176.

APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority) (2000) Review of Chlorpyrifos Chemistry assessment.
http://www.apvma.gov.au/products/review/current/chlorpyrifos_chemistry.php

Arnot J.A., Gobas F. (2006) A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental review*, 14: 257-297.

Baird C. (1998) "Química ambiental" Editorial Reverté, pp: 303-315.

Bilenca D., Miñarro F. (2004). Identificación de áreas valiosas de pastizal (AVPs) en las pampas y campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. 1° edición, Fundación Vida Silvestre Argentina.

Bilenca D., Codesido M., Fischer C.G., Pérez Carusi L., Zufiaurre E., Abba A. (2012) Impactos de la transformación agropecuaria sobre la biodiversidad en la provincia de Buenos Aires. *Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat*, 14 (2). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Versión On-line ISSN 1853-0400.
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1853-04002012000200003&script=sci_arttext

Bollmohr S., Van den Brink P.J., Wade P.W., Day J.A., Schulz R. (2009) Spatial and temporal variability in particle-bound pesticide exposure and their effects on benthic community structure in a temporarily open estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 82: 50-60.

Bondarenko S., Gan J.Y. (2004). Degradation and sorption of selected organophosphate and carbamate insecticides in urban stream sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(8): 1809-1814.

Burgueño G. (2005) Manejo de la vegetación en reservas naturales urbanas de la región metropolitana de Buenos Aires. Aves Argentinas. Asociación Ornitológica del Plata. Proyecto "Reservas Naturales Urbanas".

http://www.avesargentinas.org.ar/cs/educacion/MANEJO_de_la_VEGETACION.pdf

Cáceres T., Wenxiang H., Naidu R., Megharaj M. (2007) Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water. *Water Research*, 41: 4497 – 4503.

Carriquiriborde P. (2010) Toxicidad de Glifosato en Peces Autóctonos: Estudios de laboratorio y campo. Aspectos Ambientales del Uso de Glifosato. Ediciones INTA.

Carson R. (2002) *Silent Spring*, vol. 1, 40th Anniversary Edition edit. Houghton Mifflin Harcourt.

CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes) (2011) Guía de productos sanitarios para la República Argentina. Edición impresa. 15va Edición.

CASAFE (2013) <http://www.casafe.org/biblioteca/estadisticas/>

Casas R.R. (2002) La conservación de los suelos y la sustentabilidad de los sistemas agrícolas. Disertación premio Ing. A Prego 2000. 23 pp.
http://anterior.inta.gov.ar/suelos/actualidad/conferencias/Disertacion_R_Casas.htm

CCME (Canadian Environmental Quality Guidelines) (1999) Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.

Chang H.Y., Lin Y.M., Hsu P.C., Guo Y.L. (2001) Reduction of sperm motility in a male laboratory workers exposed to solvent study: a case study. *Environmental Health Perspectives*, 109: 753–756.

Cisneros F.V. (1995) Control de plagas agrícolas.
http://www.avocadosource.com/books/cisnerosfausto1995/cpa_toc.htm

Cornelissen G., Gustafsson O., Bucheli T.D., Jonker M.T.O., Koelmans A., van Noort P.C.M. (2005) Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 6881–6895.

Cox (1994) Chlorpyrifos, part 1: toxicology. Journal of pesticide reform. Winter (14) 4.
<http://www.pesticide.org/get-the-facts/pesticide-factsheets/factsheets/chlorpyrifos>

Stenersen J. (2004) Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology, CRC Press, Boca Raton, 276 pp.
<http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Plant-Pathology/Chemical-Pesticides.pdf>

De Silva P.M.C.S, Samayawardhena L.A. (2005) Effects of chlorpyrifos on reproductive performances of guppy (*Poecilia reticulata*). Chemosphere, 58: 1293–1299.

ECB (European Chemicals Bureau) (2003) Institute for Health and Consumer Protection. Technical guidance document on risk assessment Part II. Environmental risk assessment. European Chemicals Bureau Office for Publications of the European Communities, Luxembourg.

Eddins D., Cerutti D., Williams P., Linney E., Levin E.D. (2010) Zebrafish provide a sensitive model of persisting neurobehavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure: Comparison with nicotine and pilocarpine effects and relationship to dopamine deficits. Neurotoxicology and Teratology, 32: 99–108.

EFSA (European Food Safety) (2005) Review report for the active substance chlorpyrifos. SANCO/3059/99, rev. 1.5. European Food Safety Authority.
http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_chlorpyrifos.pdf

Eisler R. (2000) Handbook of Chemical Risk Assessment. Health Hazards to Humans, Plants, and Animals. Volume 2: Organics. Lewis Publishers, Washington, D.C. Chapter 14. pp. 883-902.

FAO (Food and Agriculture Organization) (2006) FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides: chlorpyrifos.
<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/chlorpyr.pdf>

Fukuto T.R. (1990) Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. Environmental Health Perspectives, 87: 245-254.

Gebremariam S. Y., Beutel M. W., Yonge D. R., Flury M., Harsh J. B. (2012) Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 215: 123–175.

Greco S., Tognolli A. (2102) Agroecosistema, de la asignatura Ecología Agrícola y Protección Ambiental. Material de lectura elaborado correspondiente a la carrera Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.

http://campus.fca.uncu.edu.ar:8010/pluginfile.php/17386/mod_resource/content/3/2013-%20VII-%20Agroecosistemas.pdf

Giesy J.P, Solomon K.R., Coates J.R., Doxon K. R., Giddings J.M., Kenaga E.E. (1999) Chlorpyrifos: Ecological risk assessment in North American environments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 160: 1-130.

Gray J.S. (2002) Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Marine Pollution Bulletin*, 45: 46–52.

Hauser R., Williams P., Altshul L., Calafat A.M. (2005) Evidence of interaction between polychlorinated biphenyls and phthalate in relation to human sperm motility. *Environmental Health Perspectives*, 113 (4): 425–430.

Heredia O. (2010) Calidad de agua para riego, pp: 139-149. Aspectos Ambientales de las Actividades Agropecuarias. Ed. Agroveter, 2^{ed}.

Hyne R.V., Maher W.A. (2003) Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 366–374.

Igarzábal D. (2008) Capítulo 8: Insecticidas. La importancia del control de plagas en la agricultura: insecticidas-fungicidas-herbicidas. Ediciones CASAFA.

<http://agrolinux.agrositio.com/casafe/pdf/CAP%2008.pdf>

Jantunen A.P.K., Tuikka A., Akkanen J., Kukkonen J.V.K. (2008) Bioaccumulation of atrazine and chlorpyrifos to *Lumbriculus variegatus* from lake sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 860–868.

Jarvinen A.W., Nordling B.R., Henry M.E. (1983) Chronic toxicity of Dursban (chlorpyrifos) to the fathead minnow (*Pimephales promelas*) and the resultant acetylcholinesterase inhibition. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 7 (4): 423-434.

Jergentz S., Pessacq P., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. (2004) Linking in situ bioassays and dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 59: 133– 141.

Jergentz S., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. (2005) Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61: 817–826.

Lal S., Saxena D.M., Lal R. (1987) Bioconcentration and metabolism of DDT, fenitrothion and chlorpyrifos by the blue-green algae *Anabaena sp.* and *Aulosira fertilissima*. *Environ. Pollut.*, 46 (3): 187–196.

Loewy R.M., Monza L.B., Kirs V.E. y Savini M.C. (2011). Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *J. Environ. Sci. Health B.*, 46 (8): 662-670.

MacLachlan D.J., Bhula R. (2009) Transfer of lipid-soluble pesticides from contaminated feed to livestock, and residue management. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 149 (3-4): 307–321.

Marino D., Ronco A. (2005) Cypermethrin and Chlorpyrifos Concentration Levels in Surface Water Bodies of the Pampa Ondulada. Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 75: 820–826.

Mehler W. T., Schuler L. J., Lydy M. J. (2008) “Examining the joint toxicity of chlorpyrifos and atrazine in the aquatic species: *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* and *Chironomus tentans*”. *Environmental Pollution*, 152: 217-224.

Metcalf R.L. (1974) A laboratory model ecosystem to evaluate compounds producing biological magnification. *Essays Toxicol.*, 5: 17–28.

Montagna M., Collins P.A. (2008) Oxygen consumption and ammonia excretion of the freshwater crab *Trichodactylus borellianus* exposed to chlorpyrifos and endosulfan insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92: 150–155.

Mugni H., Ronco A., Bonetto C. (2011) Insecticide toxicity to *Hyalella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 350–354.

Mugni H., Demetrio P., Paracampo A., Pardi M., Bulus G., Bonetto C. (2012) Toxicity persistence in runoff water and soil in experimental soybean plots following chlorpyrifos application. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 89(1): 208-12.

NMFS (National Marine Fisheries Service Endangered Species) (2008) Section 7 Consultation Biological Opinion. EPA Registration of Pesticides Containing Chlorpyrifos, Diazinon, and Malathion (November 18, 2008). National Marine Fisheries Service. http://www.nmfs.noaa.gov/pr/pdfs/pesticide_biop.pdf.

Noble A. (1993) Partition coefficients (n-octanol–water) for pesticides. *J. Chromatogr.*, 642, 3–14.

Odenkirchen E.W., Eisler R. (1988) Chlorpyrifos hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep.* 85 (1.13).

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) (1995) OECD environment monographs No. 92, OECD environmental health and safety publications, series on testing and assessment, No. 3, guidance document for aquatic effects assessment. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.

Papa J.C. (2007) El modo de acción de los herbicidas. *Jornadas de Actualización. Elementos fundamentales para el buen uso de fitoterápicos: dosis, modo de acción y prevención de deriva.* Sociedad Rural de Tucumán.

Peña C.E., Carter D.E., Ayala Fierro F. (2001) *Toxicología ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental.* Editado por SHWP.

Pesticide Properties DataBase (PPDB) (2012) University of Hertfordshire.
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/>

Quirós R., Rennella A.M., Boveri M.B., Rosso J.J., Sosnovsky A. (2002) Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología Austral*, 12: 175-185. Asociación Argentina de Ecología.

Quirós R., Boveri M.B., Petracchi C.A., Rennella A.M., Rosso J.J., Sosnovsky A., von Bernard H.T. (2006) Los efectos de la agriculturización del humedal pampeano sobre la eutrofización de sus lagunas. *Eutrofização na América do Sul: Causas, conseqüências e tecnologias de gerenciamento e controle*, 1-16.

Racke K.D. (1993) Environmental fate of chlorpyrifos. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 131:1-150.

Reinecke S.A., Reinecke A.J. (2007) The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 244–251.

Ricklefs R.E. (1997) *Invitación a la Ecología.* Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.

Rotolo G.C., Francis C.A. (2008) *Los servicios ecosistémicos en el “corazón” agrícola de Argentina.* Ediciones INTA.

http://inta.gob.ar/documentos/los-servicios-ecosistemas-en-el-2011-corazon201d-agricola-de-argentina/at_multi_download/file/los-servicios-ecosist%C3%A9micos-en-el-coraz%C3%B3n-agricola.pdf.

Sardar D., Kole R.K. (2005) Metabolism of chlorpyrifos in relation to its effect on the availability of some plant nutrients. *Chemosphere*, 61:1273-80.

Schönbrunn E., Eschenburg S., Shuttleworth W.A., Schloss J.V., Amrhein N., Evans J.N.S., Kabsch W. (2001) Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 1376-1380.

Serrano R., Lopez F.J., Hernandez F., Pena J.B. (1997) Bioconcentration of chlorpyrifos, chlorfenvinphos, and methidathion in *Mytilus galloprovincialis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59:968-75.

SIIA (Sistema Integrado de Información Agropecuaria) (2013)
<http://old.siia.gov.ar/>

Singh P.B., Singh V. (2008) Pesticide bioaccumulation and plasma sex steroids in fishes during breeding phase from north India. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25: 342-350.

Sotomayor V. (2011) Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la expresión génica de embriones de *Rhinella arenarum*. Mecanismos de acción y vías de señalización. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires.

Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación (2005). Clorpirifos. Desarrollo de los niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondiente al clorpirifos.

<http://www.pnuma.org/agua-miaac/CODIA%20CALIDAD%20DE%20LAS%20AGUAS/MATERIAL%20ADICIONAL/PONENCIAS/PONENTES/Tema%205%20Niveles%20Guías%20Calidad%20de%20Aguas/NIVELES%20GUIA/4%20-%20Desarrollos/clorpirifos.pdf>

Traina M.E., Age P., Siepi G., Urbani E., Petrelli M.G. (1994) A review of effect of pesticide formulations on male fertility. *International Journal of Environment Health Research*, 4: 38-47.

Turner L. (2003) Chlorpyrifos Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead. Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs (USEPA/OPP).

<http://www.epa.gov/espp/litstatus/effects/chlorpyrifos-analysis.pdf>

USDA (U.S. Department of Agriculture, Agricultural Marketing Service) (2007) Pesticide Data Program Annual Summary, Calendar Year 2007. Washington, DC, 2008.

<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5074338>

USEPA (1986) Ambient aquatic life water quality criteria for chlorpyrifos. Office of Water Regulations and Standards Criteria and Standards Division Washington. EPA 440/5-86-005.

http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/upload/2001_10_12_criteria_ambientwqc_chlorpyrifos86.pdf

USEPA (1991) Water Quality Criteria Summary. Bulletin from the Office of Science and Technology, Health and Ecological Criteria Division. Washington, DC.

USEPA (2002) Interim reregistration eligibility decision (IRED) for chlorpyrifos. EPA 738-R-01-007.

http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/chlorpyrifos_ired.pdf

USEPA (2006) Finalization of Interim Reregistration Eligibility Decisions (IREDs) and Interim Tolerance Reassessment and Risk Management Decisions (TREDs) for the Organophosphate Pesticides, and Completion of the Tolerance Reassessment and Reregistration Eligibility Process for the Organophosphate Pesticides.

http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/chlorpyrifos_red.pdf

USEPA (2009) Chlorpyrifos Summary Document Registration Review: Initial Docket EPA-HQ-OPP-2008-0850. United States Environmental Protection Agency, Washington.

USEPA (2011) Memorandum. Chlorpyrifos: Preliminary Human Health Risk Assessment for Registration Review. DP No. D388070. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

USEPA (2013) Chlorpyrifos Preliminary Evaluation of the Potential Risks from Volatilization. EPA-HQ-OPP-2008-0850-0114. United States Environmental Protection Agency, Washington D.C.

Varo I., Serrano R., Pitarch E., Amat F., López F.J., Navarro J.C. (2002) Bioaccumulation of Chlorpyrifos Through an Experimental Food Chain: Study of Protein HSP70 as Biomarker of Sublethal Stress in Fish. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 42: 229–235.

Watts M. (2012) Chlorpyrifos as a possible global POP for Pesticide Action Network North America.

http://www.pan-europe.info/News/PR/121009_Chlorpyrifos_as_POP_final.pdf

Welling W., de Vries J.W. (1992) Bioconcentration kinetics of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos in guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 23: 64-75.

WHO (World Health Organization) (2009) Chlorpyrifos. Specifications and evaluations for public health pesticides.

http://www.who.int/whopes/quality/Chlorpyrifos_WHO_specs_eval_Mar_2009.pdf

Woodburn K.B., Hansen S.C., Roth G.A., Strauss K. (2003) The bioconcentration and metabolism of chlorpyrifos by the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22(2):276-84.

Zhao Q., Dourson M., Gadagbui B. (2006) A review of the reference dose for chlorpyrifos. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44: 111-124.

-I-

ESTUDIOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO
DEL CLORPIRIFOS EN MATRICES SÓLIDAS

-CAPÍTULO 2-

COMPORTAMIENTO DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS EN SUELOS Y SEDIMENTOS CON DIFERENTE CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

2.1. INTRODUCCIÓN

La provincia de Buenos Aires ha venido siendo objeto, en los últimos 30 años, de una notable expansión de las actividades agropecuarias, sobre la base de la incorporación de nuevas tecnologías, el incremento de la especialización y la reducción de la biodiversidad para satisfacer la creciente demanda de alimentos. El aumento de la superficie cultivada trajo, como consecuencia, un aumento en el uso de agroquímicos, debido a que la intensificación requiere de una lucha cada vez más agresiva contra plagas, parásitos y otros factores nocivos (Alvarez *et al.*, 2013).

En las regiones intensamente cultivadas, los cuerpos de agua se ven gravemente afectados por la entrada de productos agroquímicos como los plaguicidas y nutrientes que a menudo entran en las corrientes asociadas a las partículas del suelo como resultado de la escorrentía desde las tierras agrícolas (Cooper *et al.*, 2000; Jergentz *et al.*, 2005; Mugni *et al.*, 2011, 2012).

La *movilidad* en el suelo y la *persistencia* de un pesticida son dos características indispensables para determinar si el mismo representa o no una amenaza para la salud humana y animal. La movilidad depende del contenido de agua, de la cantidad de materia orgánica del suelo, del exceso de irrigación y/o precipitación y del grado de adsorción del pesticida a la materia orgánica o a los minerales del suelo (Watson, 1996). En cambio, la persistencia dependerá de la degradación biológica, de la tasa de aplicación del producto, del tipo de ecosistema y de otros procesos abióticos como la hidrólisis enzimática. En el caso del clorpirifos, la persistencia se verá incrementada por la disminución del PH y/o la temperatura y la falta de oxígeno (USEPA, 1999; Turner, 2003), como así también por el contenido de materia orgánica del suelo que parece ser un factor predominante en su retención (Stevenson, 1972; Coquet, 2002; Spark y Swift, 2002; Boivin *et al.*, 2005).

El clorpirifos es uno de los pesticidas más comúnmente detectados en aguas superficiales y subterráneas de algunas regiones del mundo. Se lo suele encontrar en altas concentraciones y en un mayor número de muestras de agua, cuándo se lo compara con otros compuestos organofosforados (Giesy *et al.*, 1999; USGS, 2000). La aplicación aérea de este y otros pesticidas, proporciona una vía para la contaminación de los cursos de agua cercanos (Mugni *et al.*, 2011, 2012) y su transporte aéreo que deriva de la pulverización. Este insecticida llega por escorrentía a los cuerpos de agua superficiales adsorbido a las partículas del suelo más que disuelto en el agua de lluvia y/o de irrigación (Giesy *et al.*, 1999). Una vez que llega al cuerpo de agua desde las áreas agrícolas dónde fue aplicado, se une a la materia orgánica del material particulado de la columna de agua y de los sedimentos del fondo (Hughes *et al.*, 1980; USEPA, 1986). Se ha sugerido que el clorpirifos y otros compuestos organofosforados pueden acumularse en los tejidos y así generar un riesgo potencial para los seres humanos y otros organismos (Serrano *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2005). Por esa razón, constituye una amenaza para las especies acuáticas cuándo alcanza los cuerpos de agua (ATSDR, 2011). En la Figura 2.1 se observan los principales mecanismos de distribución del clorpirifos.

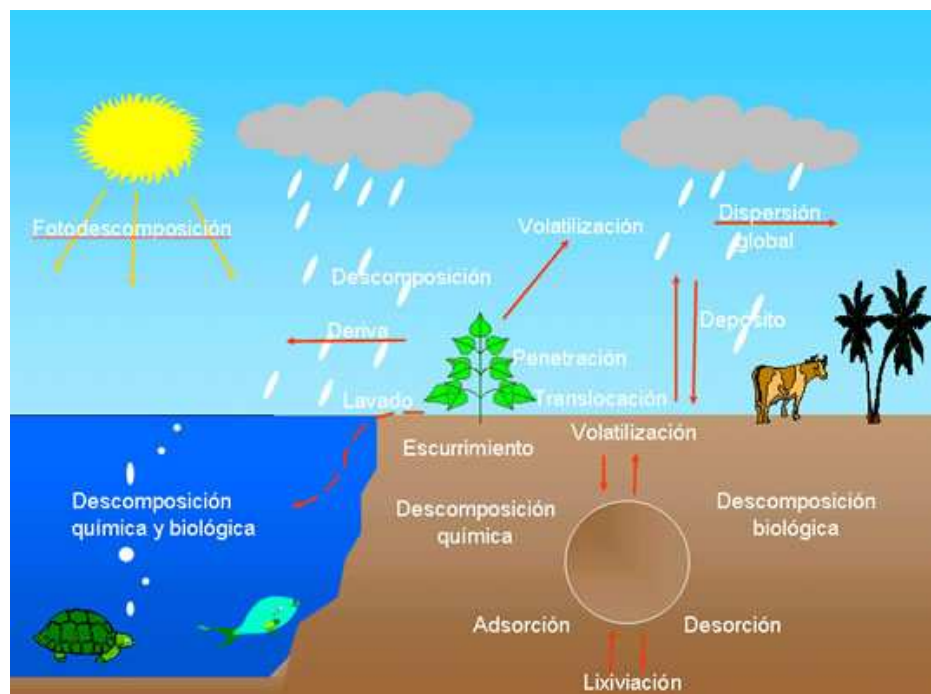


Figura 2.1. Principales procesos que afectan la movilidad y persistencia de los plaguicidas en la biosfera. (Fuente: <http://lezlyquim.blogspot.com.ar/>)

Se han realizado una serie de estudios tendientes a estudiar la afinidad de los diferentes plaguicidas con el suelo, pero sólo unos pocos se refieren al clorpirifos. En China (Shao-Nan *et al.*, 2007) se ha estudiado la movilidad de los pesticidas en los suelos, usando los mismos como fases estacionarias en cromatografía en capa delgada. Se estableció la correlación entre los R_f s y los contenidos de materia orgánica, pH, capacidad de intercambio catiónico y contenido de arcilla. Gebremariam *et al.* (2011) realizaron experiencias de adsorción/desorción con clorpirifos en ocho suelos y sedimentos de Washington y el norte de Idaho, y propusieron que la partición del plaguicida no puede ser completamente explicada por la fracción de materia orgánica del suelo o el contenido de carbono.

En nuestro país, los estudios sobre la posible contaminación causada por el clorpirifos son escasos. Hay varios trabajos que informan la presencia de este compuesto en cuerpos de agua circundantes a zonas cultivadas (Jergentz *et al.*, 2004; Jergentz *et al.*, 2005; Marino y Ronco, 2005; Mugni *et al.*, 2011, 2012). Por lo que sabemos, no hay estudios sobre la afinidad de clorpirifos con suelos de la región.

Con el fin de evitar posibles daños al ambiente causados por la aplicación de este insecticida, es necesario conocer los mecanismos que gobiernan su transporte, y por ende llevar a cabo experiencias sobre la interacción del mismo con suelos de nuestro país. De esta manera se podrá evaluar el impacto causado por su aplicación en los cultivos.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Origen de las muestras

Las experiencias se diseñaron con tres tipos de marices sólidas (A, B y C) con distinto contenido de materia orgánica. Todas las muestras fueron analizadas previamente para descartar su contaminación con clorpirifos. Los sitios de obtención de las matrices se observan en la Figura 2.2.

- **Matriz A** suelo de un parque urbano (predio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires).

- **Matrices B y C** sedimentos pertenecientes al arroyo Claromecó, distrito de Tres Arroyos, Buenos Aires, Argentina. Extraídas en Diciembre de 2007. Cabe destacar que cuando fueron colectadas estas matrices el insecticida de uso habitual para estos cultivos era el endosulfán, por lo cual las mismas estaban libres de clorpirifos. Esto se corroboró experimentalmente.

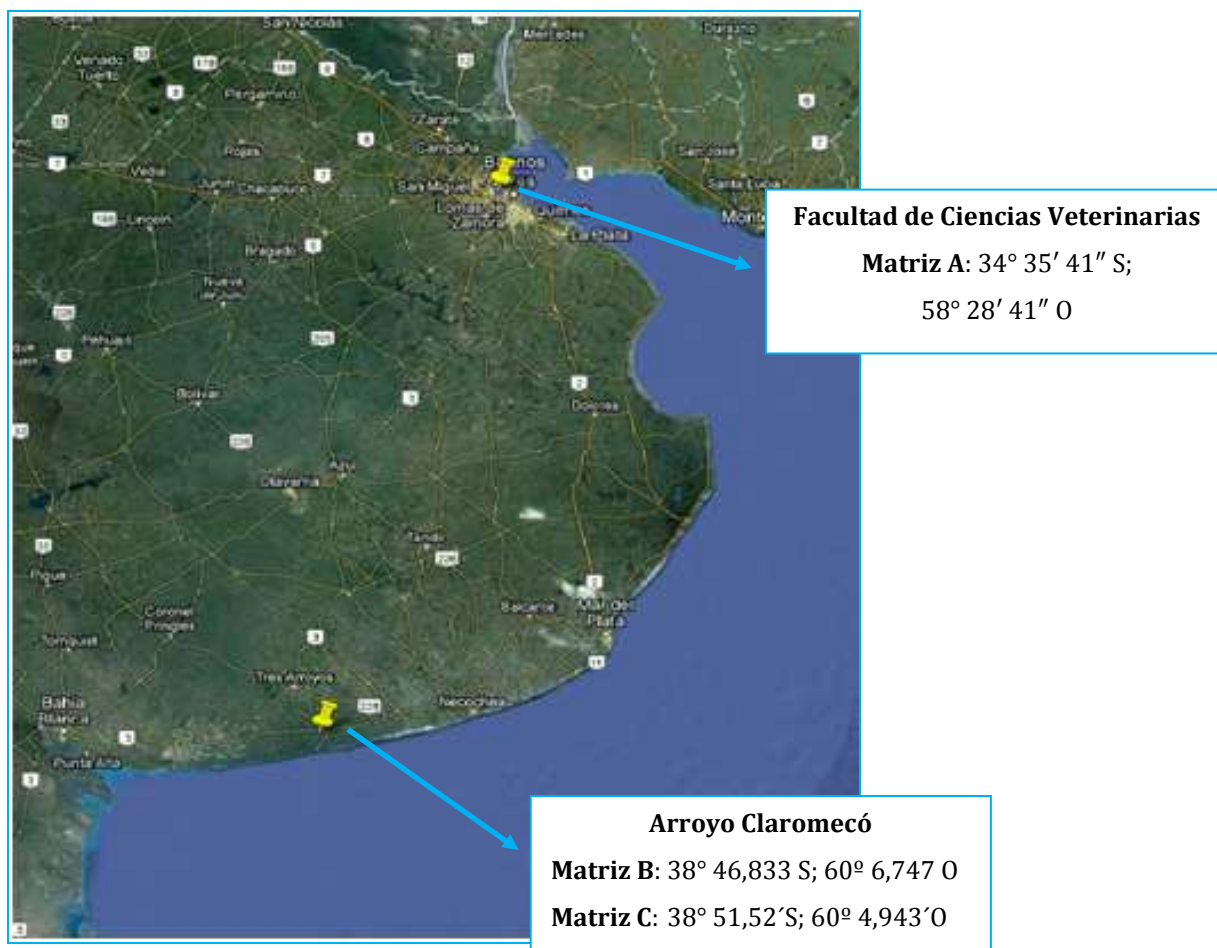


Figura 2.2. Localización de los sitios de muestreo (Fuente: <https://maps.google.com/>).

2.2.2. Caracterización de las matrices

Las matrices sólidas se analizaron para determinar fósforo extractable (Olsen), pH (1:2,5 suelo / agua), carbono orgánico (Walkley-Negro), nitrógeno (micro-Kjeldahl) y el contenido de arcilla (Bouyoucos) por métodos estandarizados (USDA, 1993; Sparks, 1996). Los resultados de los análisis de suelo se muestran en la Tabla 2.1.

Los suelos utilizados en esta tesis fueron caracterizados por la cátedra de edafología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Tabla 2.1. Caracterización química de las matrices A, B y C utilizadas para la contaminación artificial con clorpirifos.

	Localidad de origen	% Materia orgánica	% Carbono	% N	P (ppm)	PH	% arcilla	% limo	% arena
Matriz A	Capital Federal, Buenos Aires.	9,38	4,69	0,360	6,23	7,10	33	46	22
Matriz B	Claromecó, Tres Arroyos.	1,26	0,63	0,050	12	8,53	12,5	37,5	50
Matriz C	Claromecó, Tres Arroyos.	0,64	0,32	0,040	6,50	9,14	7,5	20,5	72

2.2.3. Preparación de las matrices

Antes de su uso, las muestras de suelo y sedimentos se secaron a temperatura ambiente, fueron molidas en un mortero y tamizadas (malla de 2 mm). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y el Clorpirifos de 98% de pureza se obtuvo de DuPont Argentina SA (Rosario, Argentina).

Las muestras (500 g) fueron contaminadas artificialmente con clorpirifos para obtener una concentración de 1000 µg/g. Las mezclas de A, B y C se combinaron con suelo no contaminado para obtener concentraciones de 2,5, 5, 10, 12,5, 14,7, 20, 25 y 50 µg/g. Cada una de las concentraciones se analizó por duplicado. Las muestras se dejaron reposar durante 3 días y luego se procedió a realizar la extracción.

2.2.4. Extracción

El Método EPA 3540c fue adaptado para la extracción. Las muestras contaminadas artificialmente con las concentraciones antes mencionadas (20 g) se extrajeron (Soxhlet) con 450 ml de acetona: hexano (50:50 v/v) durante 16 hs. Los extractos se pasaron a través de

una columna conteniendo 10 cm de sulfato de sodio anhidro para su secado. Luego se concentraron en un evaporador rotatorio hasta 2 ml de volumen final.

2.2.5. Cuantificación de clorpirifos

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo gaseoso con detector de captura electrónica, Perkin-Elmer Autosystem XL, siguiendo el método EPA 8.080 para compuestos clorados. Se utilizó una columna capilar Quadrex (Fase: 007-5; largo: 30 mts; DI: 0.25; film: 0.25) (temperatura inicial 100 °C sostenido por 2'; aumento de 15 °C por minuto hasta 160 °C sostenido: 0'; aumento de 5 °C por minuto hasta 270 °C sostenido: 10'). Temperatura del inyector: 225 °C; temperatura del detector: 300 °C. Se utilizó nitrógeno como gas portador (presión: 14 psi).

Para la calibración se utilizaron soluciones estándar de: 25, 50, 100, 125, 500 y 1000 µg/l ($R^2 = 0,99$). El límite de detección para el clorpirifos fue de $5 \cdot 10^{-5}$ µg/l.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La recuperación de clorpirifos se estimó como el porcentaje de la concentración inicial aplicada en cada muestra de tierra o sedimento. Se realizaron controles con muestras no contaminadas para asegurar que no hubiera contaminación durante el procedimiento.

En las Figuras 2.3, 2.4 y 2.5 se observan los porcentajes medios de recuperación de clorpirifos para cada valor de concentración en las muestras A, B y C. En ellas se destacan la influencia del contenido de materia orgánica y la dependencia de recuperación con la concentración inicial en todos los casos.

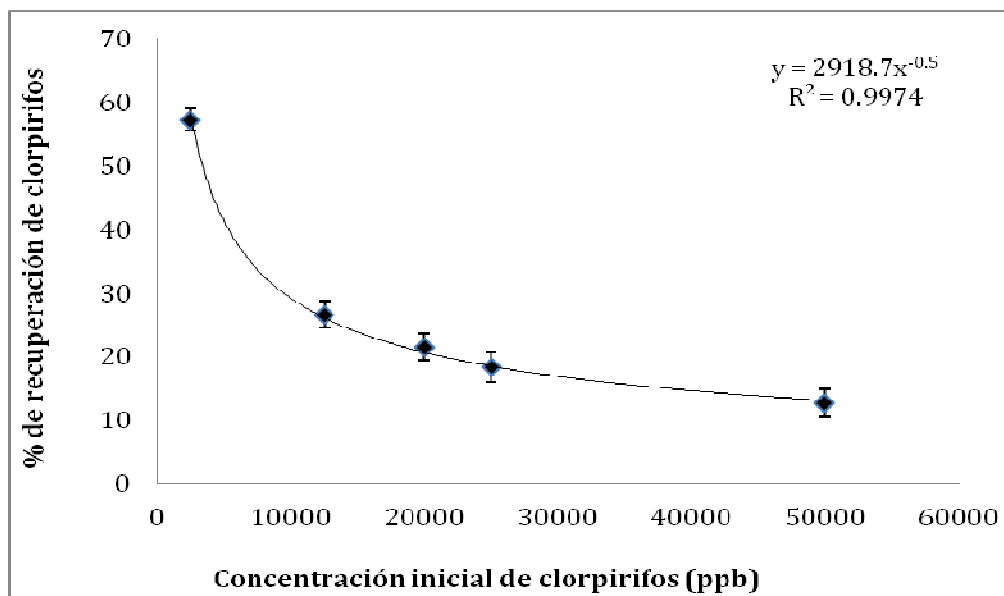


Figura 2.3. Recuperación media como porcentaje de la concentración inicial de clorpirifos en la matriz A. Datos promedio (\pm SD) de cada valor de concentración inicial analizado por duplicado. La línea muestra la tendencia a un modelo potencial ($R^2=0,9974$).

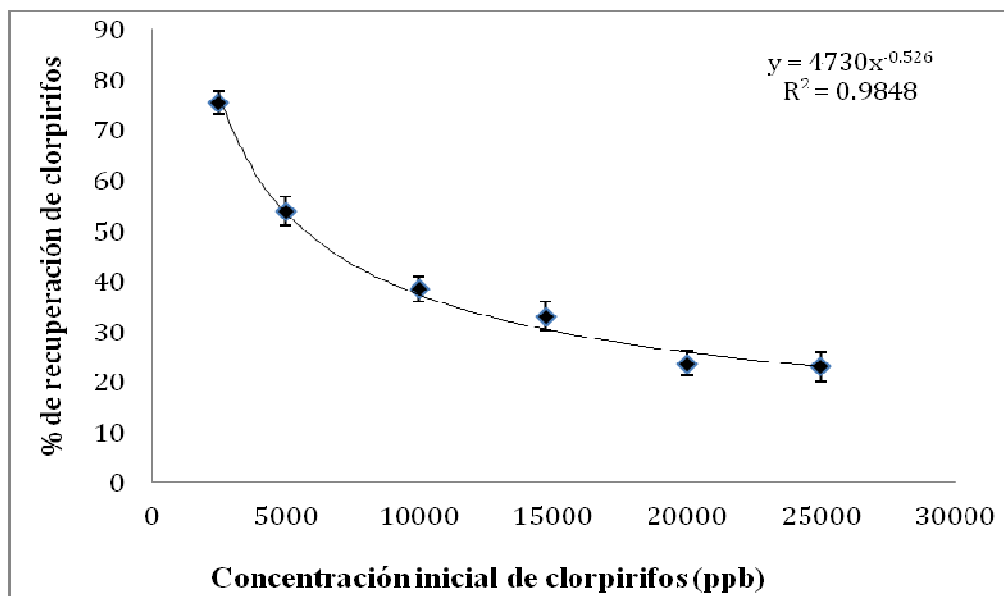


Figura 2.4. Recuperación media como porcentaje de la concentración inicial de clorpirifos en la matriz B. Datos promedio (\pm SD) de cada valor de concentración inicial analizado por duplicado. La línea muestra la tendencia a un modelo potencial ($R^2=0,9848$).

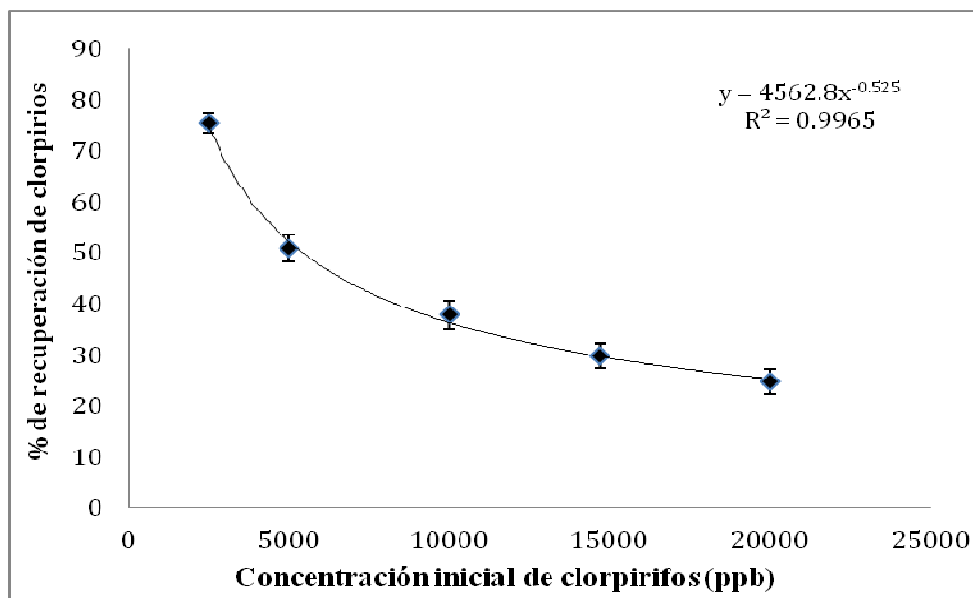


Figura 2.5. Recuperación media como porcentaje de la concentración inicial de clorpirifos en la matriz C. Datos promedio (\pm SD) de cada valor de concentración inicial analizado por duplicado. La línea muestra la tendencia a un modelo potencial ($R^2=0,9965$).

En el caso de la matriz A, con el mayor contenido de materia orgánica, se observó un máximo de 60% de recuperación a la mínima concentración empleada de 2,5 ppm, mientras que el porcentaje de recuperación disminuyó hasta un 12% a la máxima concentración inicial de 50 ppm.

En los casos de las matrices B y C, las recuperaciones variaron desde aproximadamente un 75% hasta un 25% cuándo las concentraciones iniciales fueron de 2,5 y 20 ppm.

En la matriz A se obtuvieron las menores recuperaciones, siendo la que presentó el contenido más alto de materia orgánica y el pH más bajo. En las matrices B y C, con valores más similares de contenido de materia orgánica y pH, las recuperaciones fueron semejantes a pesar de otras diferencias fisicoquímicas de sus composiciones.

Nuestros resultados son consistentes con trabajos previos de otros autores que indican que el contenido de materia orgánica del suelo y el pH son los principales factores que gobiernan la afinidad de los compuestos orgánicos con las matrices sólidas (Coquet, 2002; Boivin *et al.*, 2005; Ei Mon *et al.*, 2009). Boivin *et al.* (2005) analizaron para 13 suelos con diferentes contenidos de materia orgánica y pH, la absorción de cinco herbicidas. Uno de los

cuales la trifluralina, compuesto no polar con coeficiente de partición ($\text{Log Kow}=5,34$) similar al del clorpirifos ($\text{Log Kow}=4,7$; $\text{pka}=4,55$; ver introducción) mostraba absorciones altas en todos los suelos estudiados. En este herbicida neutro la mayor sorción se observó en el suelo con mayor contenido de materia orgánica. Resultados con otros herbicidas que se comportan como ácidos débiles como el 2,4 D (Boivin *et al.*, 2005; Ei Mon *et al.*, 2009), la atrazina (Coquet, 2002; Boivin *et al.*, 2005) y la bentazona, entre otros (Boivin *et al.*, 2005), han mostrado que además influye en su absorción el pH del suelo. Cuando los pKa de los compuestos son menores a los pH de los suelos estudiados, los tóxicos podrían estar en su forma disociada aniónica y así pasar a la fase líquida. Si bien esto no es determinante ya que otros factores podrían estar actuando, como el contenido de arcillas u otras interacciones de los compuestos analizados, es una característica a tener en cuenta en este tipo de análisis. En nuestros resultados, el menor pH del suelo podría estar indicando una menor proporción de la forma disociada del clorpirifos y por ende una mayor absorción a la matriz sólida.

En todos los casos (Figuras 2.3, 2.4 y 2.5) se observó que los porcentajes de recuperación disminuyeron con el aumento de la concentración inicial empleada. Esta observación indica que la misma tiene una fuerte influencia en la interacción del clorpirifos con la matriz sólida. Resultados que involucrarían interacciones con la matriz fueron observados por Wu *et al.* (2011) para una muestra enriquecida con clorpirifos a lo largo del tiempo. Observaron que la recuperación del mismo disminuía con los días y que esto no se debía a la degradación por microorganismos. Presumiblemente, la menor recuperación se correspondería con la existencia de efectos cooperativos entre el insecticida y el suelo estudiado.

Por otra parte, experiencias similares realizadas en nuestro laboratorio con el antibiótico veterinario monensina también mostraron dependencia de la recuperación con la concentración inicial empleada. En este caso, la recuperación aumentó con el aumento de la concentración inicial de monensina (Yoshida *et al.*, 2007).

2.4. CONCLUSIONES

En la matriz con mayor contenido de materia orgánica y menor pH se observó la menor recuperación. Estos resultados son coincidentes con trabajos de otros autores en

dónde se informó que el contenido de materia orgánica y el pH eran los factores predominantes en la retención de los plaguicidas (Coquet, 2002; Boivin *et al.*, 2005; Ei Mon *et al.*, 2009).

En todas las experiencias realizadas, se observó que los porcentajes de recuperación del clorpirifos variaban según las concentraciones iniciales empleadas.

A pesar de las diferencias en la composición química de las matrices sólidas (A, B y C), se observó una disminución importante en la recuperación con el aumento de la concentración inicial. Este comportamiento coincide con los resultados observados por Wu *et al.* (2011) en los que la recuperación del clorpirifos disminuía con el tiempo, y que según los autores esto se debía a la formación de enlaces covalentes entre el insecticida y la materia orgánica del suelo.

Nuestras observaciones sugieren que en el caso del clorpirifos, no solamente influyen el contenido de materia orgánica y el pH, sino también la cantidad inicial aplicada sobre los cultivos que alcanza los suelos. La forma en que el clorpirifos interactúa con las diferentes matrices sólidas no depende únicamente de la composición físico-química de las mismas, ya que su dependencia con la concentración inicial se observa en matrices de características bien diferenciadas. Este comportamiento podría estar originado en efectos cooperativos que operen en la interacción de este insecticida con las matrices sólidas.

A mayor cantidad aplicada, mayor probabilidad de que el pesticida alcance los cuerpos de agua superficiales por efecto de erosión y posterior escorrentía y esto representa un riesgo para el ambiente.

2.5. REFERENCIAS

Alvarez M., Du Mortier C., Fernández Cirelli A. (2013) Behavior of Insecticide Chlorpyrifos on Soils and Sediments with Different Organic Matter Content from Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Water Air Soil Pollut.*, 224:1453.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2011) Toxic Substances Portal. Chlorpyrifos.

<http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=88>.

Boivin A., Cherrier R., Schiavon M. (2005) A comparison of five pesticides adsorption and desorption processes in thirteen contrasting field soils. *Chemosphere*, 61: 668–676.

Cooper C. M., Shields F. D. Jr., Testa S., Knight S. S. (2000) Sediment retention and water quality enhancement in disturbed watersheds. *International Journal of Sediment Research*, 15 (1): 121-134.

Coquet Y. (2002) Variation of pesticide sorption isotherm in soil at the catchment scale. *Pest Management Science*, 58: 69–78.

Ei Mon E., Hirata T., Kawamoto K., Hiradate S., Komatsu T., Moldrup P. (2009) Adsorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid onto volcanic ash soils: effects of pH and soil organic matter. *EnvironmentAsia*, 1: 1–9.

Gebremariam S.Y., Beutel M.W., Flury M., Harsh J. B., Yonge D. R. (2011) Nonsingular adsorption/desorption of chlorpyrifos in soils and sediments: experimental results and modeling. *Environ. Sci. Technol.*, Article ASAP Publication Date (Web): November 16, 2011 <http://pubs.acs.org/journal/esthag>.

Gebremariam S. Y., Beutel M. W., Yonge D. R., Flury M., Harsh J. B. (2012) Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 215: 123–175.

Giesy J.P., Solomon K.R., Coates J.R., Doxon K. R., Giddings J.M., Kenaga E.E. (1999) Chlorpyrifos: Ecological risk assessment in North American environments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 160: 1-129.

<http://www.usask.ca/toxicology/jgiesy/pdf/publications/JA-195.pdf>

Hughes D.N., Boyer M.G., Papst M.H., Fowle C.D., Rees G.A.V., Baulu P. (1980) Persistence of three organophosphorus insecticides in artificial ponds and some biological implications. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 9(3): 269-279.

Jergentz S., Pessacq P., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. (2004). Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59: 133-141.

Jergentz S., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. (2005). Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61(6): 817-826.

Marino D., Ronco A. (2005). Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(4): 820-826.

Mugni H., Ronco A., Bonetto C. (2011) Insecticide toxicity to *Hyalella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 350-354.

Mugni H., Demetrio P., Paracampo A., Pardi M., Bulus G., Bonetto C. (2012) Toxicity persistence in runoff water and soil in experimental soybean plots following chlorpyrifos application. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 89(1): 208-12.

Serrano R., Lopez F. J., Hernandez F., Pena J. B. (1997) Bioconcentration of chlorpyrifos, chlorfenvinphos and methidathion in *Mytilus galloprovincialis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59: 968-975.

Shao-nan L., Yang, S., Ting Y., Wei-guo H. (2007) Relationship between mobility factors (Rf) of two hydrophobic termiticides and selected field and artificial soil parameters. *Science of the Total Environment*, 388 (1-3): 206-213.

Sparks D. L. (1996) *Methods of soil analysis: part 3—chemical methods*. Madison: ASA. SSSAV Book Series: 5.

Turner L. (2003) Chlorpyrifos Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead. Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs (USEPA/OPP).

USDA (U.S. Department of Agriculture) (1993) Soil Survey Division Staff. Soil Conservation Service. Handbook 18. United States Geological Survey.

USEPA (1986) Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Chlorpyrifos. EPA 440/5-86-005. <http://epa.gov/waterscience/criteria/library/ambientwqc/chlorpyrifos86.pdf>

USEPA (1999) Reregistration eligibility science chapter for chlorpyrifos. Fate and environmental risk assessment chapter. Office of prevention, pesticides and toxic substances. Washington D.C.

[ftp://marine.calpoly.edu/Weston/Sac%20Regional/03%20Other%20Reports%20\(SRCSD_OTHER\)/SRCSD_OTHER_024.pdf](ftp://marine.calpoly.edu/Weston/Sac%20Regional/03%20Other%20Reports%20(SRCSD_OTHER)/SRCSD_OTHER_024.pdf)

USGS (United States Geological Survey) (2000). Organophosphorus Pesticide Occurrence and Distribution in Surface and Ground Water of the United States, 1992–97. <http://pubs.usgs.gov/of/2000/ofr00-187/pdf/ofr00-187.pdf>

Wang L. G., Jiang X., Mao Y. M., Zhao Z. H., Bian Y. R. (2005) Organophosphorus pesticide extraction and cleanup from soils and measurement using GC-NPD. *Pedosphere*, 15: 386–394.

Watson J.E. (1996) Capítulo 17: Pesticides as a source of pollution. *Pollution Science*, Academic Press, pp 253-277.

Wu X.M., Yu Y.L., Li M., Long Y.H., Fang H., Li S.N. (2011) Prediction of bioavailability of chlorpyrifos residues in soil to earthworms. *Journal Soil Sci. Plant Nutrition*, 11 (1): 44 – 57.

Yoshida N., Castro M., du Mortier C., Fernández Cirelli, A. (2007) Environmental behavior of antibiotic monensin: preliminary studies in Argentina. *Environmental Chemistry Letters*, 5: 157–160.

-CAPÍTULO 3-

ESTUDIO DE LA PERSISTENCIA DE UN FORMULADO COMERCIAL DEL CLORPIRIFOS EN UN SUELO AGRÍCOLA DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

3.1. INTRODUCCIÓN

El clorpirifos es un insecticida considerado como persistente en el ambiente (Watts, 2012). Los compuestos tóxicos pueden sufrir en el suelo procesos de biodegradación (ruptura de ese compuesto orgánico por parte de los microorganismos). Dependiendo del tóxico del cual se trate, la degradación será completa (mineralización) o incompleta. La mineralización es la oxidación total del compuesto orgánico y la formación de dióxido de carbono y agua. Algunos compuestos orgánicos son degradados parcialmente en lo que se denomina biotransformación (se altera la estructura química del compuesto original). La biodegradación comprende una serie de etapas de degradación biológica que dan como resultado final la oxidación del compuesto original. Las etapas están catalizadas por enzimas producidas por los microorganismos, que pueden encontrarse dentro de las células o bien ser liberadas al medio (exoenzimas). Esta transformación química provoca que el plaguicida se vuelva más o menos tóxico dependiendo de su producto final, siendo en el primer caso una activación y en el

segundo una inactivación o detoxificación. La biotransformación es el proceso metabólico más determinante del comportamiento del plaguicida (Planes y Castro com. per., 2009). En el caso particular del clorpirifos, los dos mecanismos más importantes de degradación son la hidrólisis, que puede ser tanto química como biológica y la oxidación (Giesy *et al.*, 1999).

Las características que posee el clorpirifos hacen que este compuesto sea muy peligroso para los invertebrados y vertebrados entre los cuales se encuentra el ser humano. Su peso molecular es de 350,62, su punto de fusión se encuentra en el rango de los 41,5 a 44 °C (USEPA, 1999), posee baja solubilidad en agua (139 mg/l) y una presión de vapor de 2,49 MPa a 25 °C. Se sospecha que puede acumularse en los tejidos creando un riesgo potencial para los seres vivos (Serrano *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2005). Tiene una toxicidad intermedia para los mamíferos y puede afectar el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular, y las vías respiratorias, como así también generar irritación cutánea y ocular (Oliver *et al.*, 2000). El clorpirifos ha sido añadido en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE (Unión Europea, 2005) y se encuentra bajo estudio en la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2011 a, b).

Conocer las características de sorción y la persistencia de un compuesto xenobiótico particular en el medio ambiente, es esencial para evaluar sus potenciales efectos de contaminación. El parámetro que se utiliza para expresar la degradación de los pesticidas en las matrices sólidas y líquidas es el tiempo de vida media. Este expresa en días el tiempo que tarda un compuesto orgánico en alcanzar la mitad de su concentración inicial. Se ha informado de que el clorpirifos es moderadamente persistente en suelos con una vida media que oscila de 1 a más de 240 días, dependiendo del tipo de suelo, humedad, pH, temperatura, contenido de carbono orgánico, tipo de suelo, formulación del pesticida, tipo y cantidad de microorganismos del suelo, condiciones climáticas y concentraciones aplicadas (Getzin, 1981; Racke *et al.*, 1990; Racke, 1993; Racke *et al.*, 1996; Awasthi y Prakash, 1997; Singh *et al.*, 2002, 2003; Pandey y Singh, 2004; Gebremariam *et al.*, 2012; Alvarez *et al.*, 2013).

Sus productos de biodegradación incluyen al 3,4,6-tricloro-2-piridinol (TCP) que posteriormente se descompone a compuestos organoclorados y dióxido de carbono. En algunos casos, la vida media del clorpirifos en los sedimentos es de 5-6 años, cuando se lo considera desde el punto de vista de la mineralización completa (Gebremariam y Beutel,

2010). Por lo tanto, el pesticida y/o sus metabolitos pueden persistir en ambientes acuáticos durante décadas antes de que se degraden por completo.

Se han realizado una serie de estudios que tienden a estudiar la afinidad de los diferentes plaguicidas con el suelo, pero sólo unos pocos se refieren al clorpirifos (Jergentz *et al.*, 2004, 2005; Marino y Ronco, 2005). En Argentina no existen estudios de persistencia en suelos de la región realizados con productos formulados.

Debido a que el clorpirifos se utiliza ampliamente en nuestro país (61 millones de U\$S de ventas anuales en el año 2012) (CASAFA, 2013), su uso intensivo ha llevado a la contaminación de una amplia gama de ecosistemas terrestres y por ello hay una necesidad imperiosa de evaluar el comportamiento ambiental de este insecticida y sus efectos.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Origen de las muestras de suelo

Las muestras de suelo se obtuvieron en la localidad de Navarro, provincia de Buenos Aires (Figura 3.1), a 48 m sobre el nivel del mar. Navarro se encuentra en la cuenca del río Salado, en la Pampa Deprimida, donde la precipitación media anual es de entre 900-1.000 mm.



Figura 3.1. Localización del sitio de muestreo (Fuente: <https://maps.google.com/>).

3.2.2. Caracterización del suelo utilizado en los estudios de interacción y persistencia

Antes de realizar las experiencias, el suelo fue caracterizado y analizado para asegurar la ausencia de clorpirifos. Se determinaron las siguientes características de las matrices sólidas: fósforo extractable (Olsen), pH (1:2,5 suelo/agua), carbono orgánico (Walkley-Negro), nitrógeno (micro-Kjeldahl) y el contenido de arcilla (Bouyoucos) por métodos estandarizados (Sparks, 1996, USDA, 1993). Los resultados de los análisis de suelo se muestran en la Tabla 3.1. Los suelos utilizados en esta tesis fueron caracterizados por la cátedra de edafología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Tabla 3.1. Caracterización química del suelo de Navarro.

% Materia orgánica	% Carbono	% Nitrógeno	% Fósforo	pH
1,82	0,91	0,36	12,57	7,05

3.2.3. Preparación de los suelos para los estudios de interacción y persistencia

Las muestras de suelo se colectaron a 10 cm de profundidad, se secaron a temperatura ambiente, fueron molidas en un mortero, tamizadas (malla de 2 mm) y almacenadas en recipientes de vidrio a temperatura ambiente (20–25 °C).

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y el Clorpirifos comercial fue el Pirfos Glex de 48% Pureza (Punch Química S.A.) Se utilizaron diclorometano, acetona y hexano (Sintorgan) como solventes de grado analítico.

Para los estudios de interacción y degradación, las soluciones del formulado de clorpirifos (O,O-dietil- O-(fosforotioato 3,5,5-tricloro-2-piridil) fueron preparadas por una dilución de 1 ml de la formulación comercial en 99 ml de acetona/hexano (1:1). Las soluciones utilizadas para la curva de calibración se prepararon a través de una dilución de la solución madre con acetona/hexano (1:1) o diclorometano.

3.2.4. Cálculo de la capacidad de campo de los suelos

La capacidad de campo (CC) o capacidad de retención de los suelos se determinó por el método descrito por Mizuno *et al.* (1978). Según este método la capacidad de campo es considerada como la humedad retenida en el perfil de un suelo con humedad distribuida uniformemente que ha dejado de drenar (Cavazza *et al.*, 2007), el punto de máxima disponibilidad de agua una vez drenados los poros mayores (Lenoir y Tornari, 2004). Si saturamos un suelo, la cantidad de agua que queda retenida en los poros sin ser arrastrada por el peso de la gravedad es la capacidad de campo. La constante es característica de cada suelo y depende fundamentalmente de la porosidad, textura, cantidad de materia orgánica, grado de compactación, tipo de labranza y antecedentes de la zona (climáticos, biológicos y mecánicos), entre otros (Cerisola *et al.*, 2005; Vence, 2008; Calvache, 2011; Yoshida, 2010).

Para determinar este parámetro se utilizó un recipiente de plástico con agujeros en la parte inferior, al cual se le adicionó un trozo de tela con el fin de no perder muestra en el proceso. El recipiente se llena con la muestra de suelo hasta 5 cm de la parte superior del recipiente, y se le añadió agua hasta que la muestra estaba lo suficientemente húmeda como para que empezara a drenar. Se cubrió la parte superior del recipiente con una bolsa de plástico y se revisó diariamente hasta que se observó que el suelo había dejado de drenar. Luego se tomaron dos muestras del centro del contenedor, se pesaron y se dejaron secar en el horno hasta alcanzar nuevamente el peso constante. La capacidad de campo fue de 51,75%.

La capacidad de campo fue determinada con la siguiente ecuación:

$$H = \frac{Ph - Ps}{Ps} \times 100$$

H = porcentaje de humedad

Ph = peso del suelo húmedo

Ps = peso del suelo seco

3.2.5. Recuperación de clorpirifos en los experimentos de persistencia (vida media)

Las muestras de suelo (400 g) se enriquecieron con el formulado comercial de clorpirifos para obtener concentraciones finales de 3 y 6 mg/kg. Las muestras secas (20 g) se pesaron en vasos de precipitados de vidrio de 100 ml y luego se les añadió agua hasta llegar a la cantidad predeterminada de 80% de capacidad de campo.

El 80% de capacidad de campo se utilizó en todas las experiencias, debido a que esa cantidad de agua es la que corresponde a suelos con niveles de precipitación media anual de entre 900-1.000 mm, característica de la zona de estudio.

Los suelos dispuestos dentro de los vasos de precipitados se colocaron en recipientes de plástico opacos de profundidad aproximada de 50 x 1.000 cm, tapados en oscuridad, a temperatura ambiente de 22-25 °C y medio aerobio.

El piso del gabinete estaba cubierto con agua con el fin de mantener la humedad de los suelos. Todas las muestras se pesaron tres veces a la semana, y se añadió agua en los casos en los que fue necesario para alcanzar el 80% de capacidad de campo.

Por último, se realizaron las extracciones (ver 2.2.4) a los 7, 14, 28, 35, 42 y 49 días y se analizaron por cromatografía gaseosa (ver 2.2.5) para determinar la cantidad de clorpirifos extraída en cada caso. En todos los casos las pruebas se realizaron por duplicado.

3.2.6. Recuperación del formulado comercial de clorpirifos

Las muestras de suelo (50 g) se enriquecieron con el formulado de clorpirifos para obtener las concentraciones finales de: 6, 12, 24 y 48 mg/kg. Las muestras contaminadas se dejaron reposar durante 3 días, y luego se procedió a realizar la extracción en Soxhlet y se analizaron por cromatografía gaseosa (ver 2.2.4 y 2.2.5)

La recuperación se calculó como el porcentaje de la concentración inicial aplicada. Todas las concentraciones se analizaron por duplicado y se observó una alta reproducibilidad en las extracciones. Se realizaron controles con muestras de suelos no contaminadas para descartar cualquier contaminación en el proceso

3. 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Estudios de recuperación del formulado comercial de clorpirifos

Las recuperaciones (% de la concentración inicial) se muestran en la figura 3.2. Para el clorpirifos comercial se observó el comportamiento inverso al observado con el compuesto puro 98% en el cual la recuperación del pesticida disminuía a medida que la concentración inicial aplicada aumentaba (Alvarez *et al.*, 2013a).

En el caso del formulado comercial, la recuperación aumentó conjuntamente con el incremento de la concentración inicial hasta que se superó una concentración de 24 ppm, luego de la cual se observó una abrupta disminución (Figura 3.2) (Alvarez *et al.*, 2013b). Este comportamiento podría ser explicado por la formación de enlaces covalentes entre el insecticida y el suelo estudiado. Mesa *et al.* (2005) hallaron un comportamiento similar con tres concentraciones diferentes de clorpirifos en dónde observaron mayores recuperaciones a concentraciones iniciales más altas.

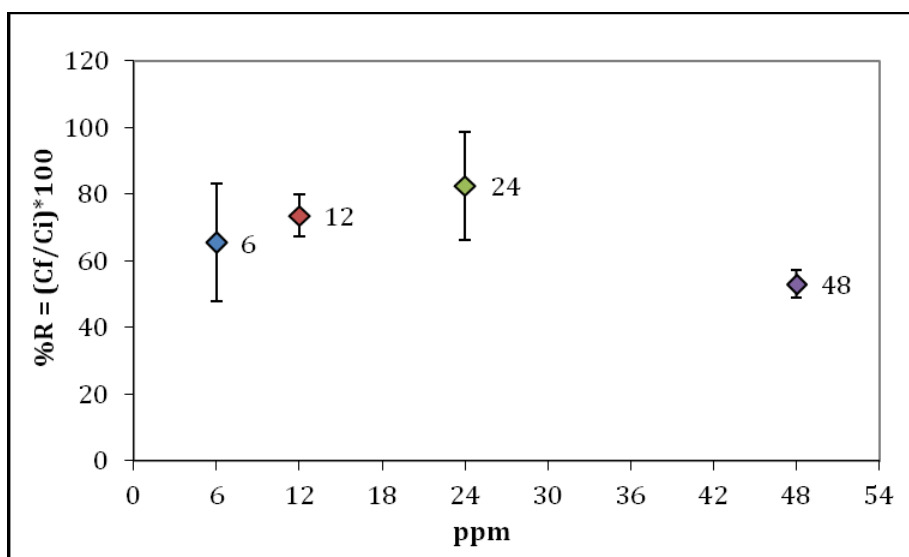


Figura 3.2. Recuperación media de clorpirifos comercial calculada como el porcentaje recuperado de la concentración inicial aplicada ($\%R = (Cf/Ci) \cdot 100$). Datos promedio (\pm SD) de cada valor de concentración inicial recuperado por duplicado.

3.3.2. Persistencia del clorpirifos comercial

Las concentraciones de clorpirifos (3 y 6 mg/kg, media de dos determinaciones) para cada tiempo de extracción (siete días), se muestran en las figuras 3.3 y 3.4. Se observó, en ambos casos, una disminución en la concentración de este insecticida que parece seguir una cinética de degradación de primer orden, considerando el hecho de que la determinación de los coeficientes (R^2) fue mayor a 0,7 (Tabla 3.2.) (Fang *et al.*, 2009; Bin *et al.*, 2011). Las funciones de primer orden estuvieron definidas por la ecuaciones $C=C_0*e^{-kt}$, en donde C fue la concentración de clorpirifos en el tiempo (t), C_0 fue la concentración inicial de clorpirifos y k fue la constante de degradación. El tiempo de vida media fue calculado como el $\ln 2/k$ (tabla 3.2).

Tabla 3.2. Cinética de la degradación de clorpirifos comercial.

Concentración de clorpirifos (mg/kg)	Función cinética	Tiempo de vida media(*) (días)	Coeficiente (R^2)
3	$C = 0,0005 * e^{-0,046x}$	15,07	$R^2 = 0,943$
6	$C = 0,0014 * e^{-0,122x}$	5,68	$R^2 = 0,896$

(*) La degradación de clorpirifos en el suelo respondió a una función de primer orden ($C=C_0*e^{-kt}$), en donde C es la concentración de clorpirifos (mg/kg) en el tiempo (t), C_0 es la concentración inicial de clorpirifos y k es la constante de degradación. El tiempo de vida media para el clorpirifos se obtuvo mediante la función $DT50 = \ln 2/k$. Cada valor se obtuvo como la media de dos repeticiones.

Las cinéticas de degradación del clorpirifos (Tabla 3.2.) muestran que, a las concentraciones iniciales de 3 y 6 mg/kg, este compuesto se degradó un 99,9% a los 21 días de iniciadas las experiencias. Nuestros resultados son coincidentes con Mesa *et al.* (2005) que informan una degradación de 96,31% en promedio, para concentraciones iniciales de clorpirifos de 0,95, 5,3 y 9,4 $\mu\text{g/g}$ a los 21 días de comenzadas las experiencias. Ellos plantean que a mayores tiempos como por ejemplo 35 días se deberían de obtener degradaciones

cercanas al 100%. En nuestro estudio las vidas medias obtenidas fueron de 15,07 días (3 ppm) y 5,68 (6 ppm) días después del tratamiento durante 42 días (Alvarez *et al.*, 2013b).

Racke *et al.* (1988) informó valores de vida media para el clorpirifos de entre 10 y 120 días y Howard (1991) de 2 semanas a más de 1 año dependiendo del tipo de suelo, el clima y otras condiciones. Esta gran variación en el tiempo de vida media del clorpirifos y otros compuestos orgánicos, se ha atribuido a cambios en factores tales como el pH, tipo de suelo, la temperatura, la humedad, el contenido de carbono orgánico y la formulación de los pesticidas (Getzin, 1981; Murray, 2001).

En este estudio las vidas medias no se extendieron significativamente con el aumento de la concentración de clorpirifos, pero son consistentes con el tiempo de vida media informado por Fang *et al.* (2008, 2009) que hallaron un DT50 de 19,2 días y 14,3 días a una concentración de clorpirifos de 4 mg/kg. Estos resultados podrían ser explicados por el hecho de que las comunidades microbianas (bacterias, hongos y actinomicetes) del suelo tienden a ser inhibidas a concentraciones de clorpirifos mayores a 10 mg/kg (Shan *et al.*, 2006) disminuyendo su degradación y aumentando su persistencia (Racke *et al.*, 1994; Baskaran *et al.*, 1999; Bondarenko y Gan, 2004; Vischetti *et al.*, 2008). Bondarenko y Gan (2004) y Vischetti *et al.* (2007, 2008) hallaron un DT50 de 20,3 y de 43 días a una concentración inicial de 10 mg/kg. Por otra parte, Racke *et al.* (1994) y Baskaran *et al.* (1999) analizaron el tiempo de vida media a concentraciones de 1000 mg/kg en suelos con contenido orgánico similar al nuestro (1,8 % CO). En el primer caso hallaron un DT50 de 214 días para una muestra de suelo con 1,9 % CO y en el segundo, un DT50 de 462 días para una muestra de suelo con 1,2 % CO.

Algunos autores sugieren que la vida media del clorpirifos tiene una correlación positiva con su concentración y que los efectos inhibitorios sobre las comunidades microbianas del suelo siguen un patrón positivo de dosis-respuesta (Gan *et al.*, 1996; Fogg *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2009). En nuestro caso, las concentraciones utilizadas en estas experiencias probablemente no fueron lo suficientemente altas para modificar la actividad microbiana del suelo o su diversidad (Shan *et al.*, 2006; Vischetti *et al.*, 2007, 2008) y el efecto de degradación fue mayor a la concentración de 6 ppm en relación a la de 3 ppm.

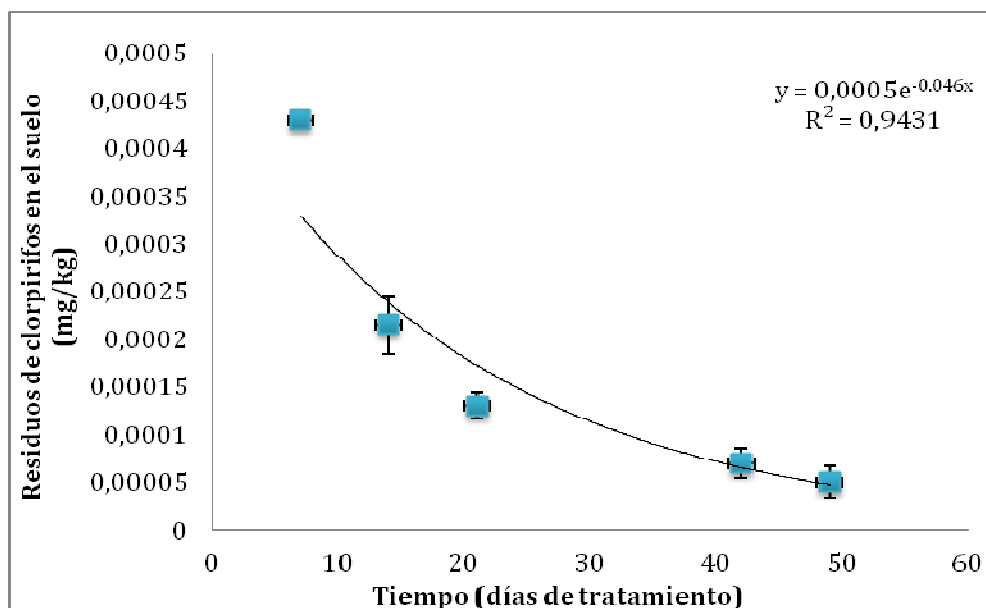


Figura 3.3. Degradación media de clorpirifos a una concentración inicial de 3 ppm. Los puntos indican datos promedio (\pm SD) de dos extracciones. La línea muestra la tendencia a un modelo exponencial ($R^2=0,9431$).

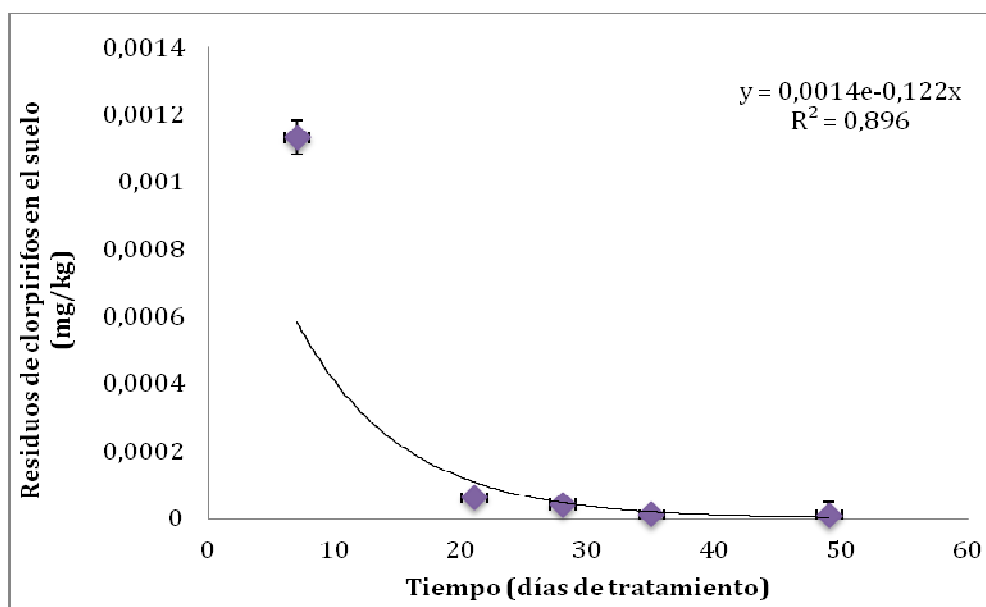


Figura 3.4. Degradación de clorpirifos a una concentración inicial de 6 ppm. Los puntos indican datos promedio (\pm SD) de dos extracciones. La línea muestra la tendencia a un modelo exponencial ($R^2=0,896$).

3.4. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo muestran que los porcentajes de recuperación del clorpirifos comercial aumentan exponencialmente con el aumento de la concentración inicial aplicada sobre el suelo hasta que se supera una concentración de 24 ppm, a partir de la cual la recuperación comienza a disminuir.

En los campos, donde este pesticida se utiliza varias veces en cada cultivo, una mayor aplicación significa un mayor aporte a los cuerpos de agua aledaños debido a la escorrentía. Esto genera como consecuencia, una mayor contaminación de los ríos y arroyos superficiales, y de la biota existente en los mismos.

Si bien se observaron diferencias en los tiempos de vida media a las dos concentraciones ensayadas (3 y 6 ppm), estos tiempos en días no fueron altos en comparación a los informados por otros autores (Racke *et al.*, 1994; Baskaran *et al.*, 1999; Bondarenko y Gan, 2004; Vischetti *et al.*, 2007, 2008). Estos resultados probablemente se deban a que dichas concentraciones no fueron lo suficientemente altas como para modificar la actividad microbiana del suelo o su diversidad.

3.5. REFERENCIAS

Alvarez M., Du Mortier C., Fernández Cirelli A. (2013a) Behavior of Insecticide Chlorpyrifos on Soils and Sediments with Different Organic Matter Content from Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Water Air Soil Pollut.*, 224:1453.

Alvarez M., du Mortier C., Sokolic T., Fernandez Cirelli A. (2013b) Studies on the Persistence of a Commercial Formulation of Chlorpyrifos on an Agricultural Soil from Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Water, Air and Soil Pollution*, 224: 1571.

Awasthi M. D., Prakash N. B. (1997). Persistence of chlorpyrifos in soils under different moisture regimes. *Pesticide Science*, 50:1–4.

Baskaran S., Kookana R.S., Naidu R. (1999) Degradation of bifenthrin, chlorpyrifos and imidacloprid in soil and bedding materials at termiticidal application rates. *Pesticide Science*, 55 (12):1222-1228.

Bin L., Chengli Y., Mingbo G., Yanfu Z., Jun Z., Changxiong Z. (2011) Adsorption and degradation of triazophos, chlorpyrifos, and their main hydrolytic metabolites in paddy soil from Chaohu Lake, China. *Journal of Environmental Management*, 92(9): 2229–2234.

Bondarenko S., Gan J.Y. (2004). Degradation and sorption of selected organophosphate and carbamate insecticides in urban stream sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(8): 1809-1814.

CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, Buenos Aires, Argentina) (2013).

Calvache M. (2011) Manejo del agua: principios fundamentales. VIII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Quito, Ecuador.

Cavazza L., Patruno A., Cirillo E. (2007) Field capacity in soils with a yearly oscillating water table. *Biosystems Engineering*, 98(3): 364–370.

Cerisola C.I., García M.G., Filgueira R.R. (2005) Distribución de la porosidad de un suelo franco arcilloso (Alfisol) en condiciones semiáridas después de 15 años bajo siembra directa. *CI. Suelo (Argentina)*, 23 (2): 167-178.

EU (European Union) (2005) Amending Council Directive 91/414/EEC to include chlorpyrifos, chlorpyrifos –methyl, mancozeb, maneb, and metiram as active substances. Official J. Eur. Union, *Comission Directive 2005/72/EC.*, p. 63.

Fang H., Yu Y., Chu X., Wang X., Chu X.Q., Pan X.D., Yang X.E. (2008) Effects of Repeated Applications of Chlorpyrifos on its Persistence and Soil Microbial Functional Diversity and

Development of its Degradation Capability. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81 (4):397–400.

Fang H., Yu Y., Chu X., Wang X., Yang X., Yu J. (2009) Degradation of chlorpyrifos in laboratory soil and its impact on soil microbial functional diversity. *Journal of Environmental Sciences*, 21: 380–386.

Fogg P., Boxall A. B. A., Walker A. (2003) Degradation of pesticides in biobeds: the effect of concentration and pesticides mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5344–5349.

Gan J., Becker R. L., Koskinen W. C., Buhler D. D. (1996) Degradation of atrazine in two soils as a function of concentration. *Journal of Environmental Quality*, 25: 1064–1072.

Gebremariam S., Beutel M. (2010) Effects of drain-fill cycling on chlorpyrifos mineralization in wetland sediment– water microcosms. *Chemosphere*, 78: 1337–1341.

Gebremariam S. Y., Beutel M. W., Yonge D. R., Flury M., Harsh J. B. (2012) Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 215: 123–175.

Getzin L.W. (1981) Degradation of chlorpyrifos in soil: influence of autoclaving, soil moisture, and temperature. *Journal of Economic Entomology*, 74: 158–162.

Giesy J.P., Solomon K.R., Coates J.R., Doxon K. R., Giddings J.M., Kenaga E.E. (1999) Chlorpyrifos: Ecological risk assessment in North American environments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 160: 1–129.

Howard P. H. (Ed.) (1991) *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals, Pesticides*, vol. 3 (pp. 5–13). Chelsea, MI: Lewis Publishers.

Jergentz S., Pessacq P., Mugni H., Bonetto C., Schulz, R. (2004) Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59: 133–141.

Jergentz S., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. (2005) Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61:817–826.

Lenoir C., Tornari G. (2004) Contaminación y tratamiento de suelo.

Marino D., Ronco A. (2005) Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada. *Argentina Bulletin Environment Contamination Toxicology*, 75(4): 820–826.

Mesa M.M.L., Mesa M., Mesa G.A.P., Gual M.C.D., Zapata G.M.M. (2005) Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Revista Facultad de Ingeniería, 33: 58-69.

Mizuno I., Arrigo N., Svartz H. (1978) Método rápido para determinar Humedad Equivalente. Buenos Aires: Actas de Reunión Argentina de la Ciencia del Suelo.

Murray R.T., Von Stein C., Kennedy I.R., Sanchez Bayo F. (2001) Stability of chlorpyrifos for termiticidal control in six australian soils. Journal Food Chemistry, 49: 2844-2847.

Oliver G. R., Bolles H. G., Shurdut B. A. (2000) Chlorpyrifos: probabilistic assessment of exposure and risk. Neurotoxicology, 21: 203-208.

Pandey S., Singh D. K. (2004) Total bacterial and fungal population after chlorpyrifos and quinalphos treatments in groundnut (*Arachis hypogaea L.*) soil. Chemosphere, 55(2): 197-205.

Planes E., Castro G.D. (2009) Capítulo 3 del Curso Semipresencial "Ecotoxicología". UNSAM, Carrera de Especialización en Evaluación de Contaminación Ambiental y su Riesgo Toxicológico. Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental.

Racke K. D., Coats J. R., Titus K. R. (1988) Degradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product, 3,5,6-trichloro-2- pyridinol, in soil. Journal of Environmental Science and Health, 23: 527-539.

Racke K. D., Laskowski D. A., Schultz M. R. (1990) Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38: 1430-1436.

Racke K.D. (1993) Environmental fate of chlorpyrifos. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 131: 1-154.

Racke K.D., Fontaine D.D., Yoder R.N., Miller J.R. (1994). Chlorpyrifos degradation in soil at termiticidal application rates. Pesticide Science, 42 (1): 43-51.

Racke K. D., Steele K. P., Yoder R. N., Dick W. A., Avidov E. (1996) Factors affecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 1582-1592.

Serrano R., Lopez F. J., Hernandez F., Pena J. B. (1997) Bioconcentration of chlorpyrifos, chlorfenvinphos, and methidathion in *Mytilus galloprovincialis*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 59: 968-975.

Shan M., Fang H., Wang, X., Feng, B., Chu, X., Yu, Y. (2006) Effect of chlorpyrifos on soil microbial populations and enzyme activities. Journal of Environmental Sciences, 18 (1): 4-5.

Singh B. K., Walker A., Wright D. J. (2002) Persistence of chlorpyrifos, fenamiphos, chlorothalonil, and pendimethalin in soil and their effects on soil microbial characteristics. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(2): 181–188.

Singh B. K., Walker A., Morgan J. A., Wright D. J. (2003) Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9): 5198–5206.

Sparks D. L. (1996) *Methods of Soil Analysis: Part 3 – Chemical Methods*. SSSAV Book Series: 5. Madison: ASA.

USDA (U.S. Department of Agriculture) (1993) Soil Survey Division Staff. *Soil Conservation Service. Handbook 18*.

USEPA (1999) Quantitative usage analysis, chlorpyrifos. US Environmental Protection Agency, 24 November 1999.

USEPA (2011a) Chlorpyrifos Preliminary Human Health Assessment for Registration Review Document ID: EPAHQ- OPP-2008-0850-0025.

USEPA (2011b) Revised Chlorpyrifos Preliminary Reg. Review Drinking Water Assessment Document ID: EPA-HQ-OPP-2008-0850-0026.

Vence B.L. (2008) Disponibilidad de agua-aire en sustratos para plantas. *CI Suelo (Argentina)*, 26 (2): 105-114.

Vischetti C., Coppola L., Monaci E., Cardinali A., Castillo M. D. (2007) Microbial impact of the pesticide chlorpyrifos on Swedish and Italian biobeds. *Agronomy for Sustainable Development*, 27(3): 267–272.

Vischetti C., Monaci E., Cardinali A., Casucci C., Perucci P. (2008) The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture. *Chemosphere* 72 (11): 1739–1743.

Wang L. G., Jiang X., Mao Y. M., Zhao Z. H., Bian Y. R. (2005). Organophosphorus pesticide extraction and cleanup from soils and measurement using GC-NPD. *Pedosphere*, 15: 386–394.

Watts M. (2012) Chlorpyrifos as a possible global POP for Pesticide Action Network North America.

Yoshida N. (2010) Comportamiento ambiental de agentes terapéuticos y promotores del crecimiento presentes en efluentes pecuarios. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Defendida el 2/06/2010.

-II-

ESTUDIOS EN MATRICES AMBIENTALES
DEL PARTIDO DE TRES ARROYOS

-II-

II.1. INTRODUCCIÓN

II.1.1. Marco geográfico

Este estudio se llevó a cabo en las localidades de Tres Arroyos y Claromecó. Las mismas se hallan localizadas al sudoeste de la provincia de Buenos Aires, a 550 km de la capital federal. El partido de Tres Arroyos pertenece a la región central del territorio Argentino denominada pampa austral (Figura II.1) que se caracteriza por ser una llanura suavemente ondulada (1,5 y 2 m/km) (Bértola *et al.*, 2009), con una superficie de 426.160 km². Ésta ocupa un 28,9% del territorio actual del país (Viglizzo *et al.*, 2011).

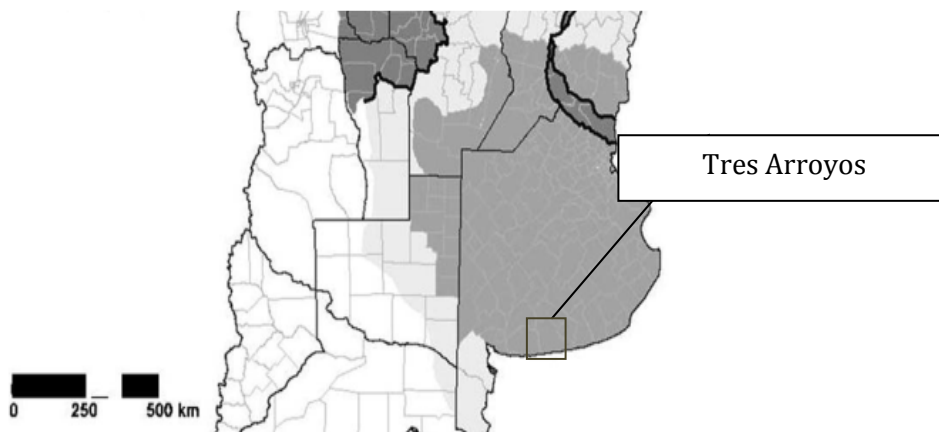


Figura II.1. Ubicación del área de estudio dentro de la Región Argentina denominada Pampa Austral o Interserrana (Modificado de Viglizzo *et al.*, 2011).

El clima es templado-oceánico de tipo subhúmedo seco, con una estación seca desde junio a septiembre y una estación lluviosa de octubre a mayo. El promedio anual de lluvias varía de 600 a 700 mm (Figura II.2), y la humedad relativa media del ambiente es de 70%. La temperatura media anual es de 15 °C, con una media máxima de 21 °C y una media mínima de 7 °C. Los vientos predominantes son los del sector norte y noroeste, aunque los valores máximos son del sector suroeste, en primavera-verano, con valores que llegan a 16,5 m/s. En promedio, los vientos poseen velocidades de entre 10-16 m/s (Cortizo y Isla, 2007; Bertola *et al.*, 2009).

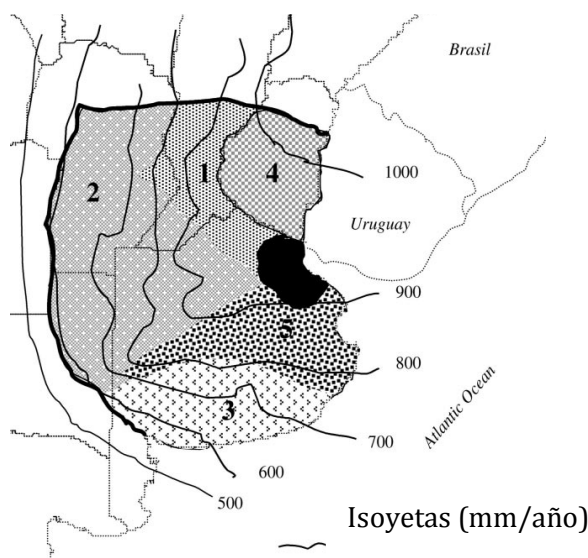


Figura II.2. Se observan las isoyetas (mm/año) en los distintos sectores de la pampa. El sector 3 corresponde a la zona de Tres Arroyos denominada “Southern Pampa” (Viglizzo *et al.*, 2001).

II.1.2. El Arroyo Claromecó y sus conflictos de usos

El arroyo Claromecó (Figura II.3) pertenece a la localidad balnearia de Claromecó que cuenta con una población estable de 2.200 habitantes. En época estival recibe unos 50.000 veraneantes. La cuenca de este arroyo desde sus inicios en la Pampa de Juárez, participa con el

8% de la producción de cereales del país, ya que posee tierras trigueras muy fértiles y de alto rendimiento en granos (Carbone *et al.*, 2006). Este arroyo que posee una pendiente de 1,11 m/Km (Bértola *et al.*, 2009) y que drena hacia el Océano Atlántico, circula a través de una zona de importancia agropecuaria y recibe gran cantidad de nutrientes y agroquímicos por escorrentía.

La cuenca del arroyo Claromecó, desde sus inicios, posee una superficie de 3.017 km² y un perímetro de 285 km. Éste arroyo es tributario de tres arroyos, A° 1, A° 2 y A° 3, que provienen de la localidad con dicho nombre. Los tributarios más importantes son el 2 y el 3, con anchos variables de 2 a 7 mts. Todos tienen barrancas de hasta 3 mts de altura. El 1 brazo posee una longitud de 24 km, el 2 de 61 y el 3 de 77,6 km (Carbone *et al.*, 2006; García Martínez *et al.*, 2008). La vegetación predominante es la estepa o pseudoestepa de gramíneas del género *Stipa* (*Stipa neesiana* o *Stipa papposa*), los arbustos están representados por las brusquillas (*Cassia tora* L.), y entre las hierbas hay verbenas del género *Glandularia*, entre otras. Por otra parte, en las orillas de los arroyos la vegetación hidrófila natural son cortaderas (*Cortaderia selloana*) y sauce criollo (*Salix Humboltiana*). La buena cobertura de vegetación herbácea existente en la cuenca del arroyo Claromecó protege las vertientes de la erosión hídrica (García Martínez *et al.*, 2008).

El arroyo Claromecó, que toma dicho nombre en la localidad balnearia, es de gran importancia para los turistas y residentes debido a las múltiples actividades recreativas que allí se practican (pesca, canotaje, avistaje de fauna, etc). El mismo divide el barrio residencial Dunamar del resto de la localidad de Claromecó, en un tramo de apenas 4,5 km de extensión, antes de su desembocadura en el mar y ofrece un paseo con 7 cascadas, de las cuales la última es la más importante en cuanto a su magnitud ⁽¹⁾.



Figura II.3. Fotografía de tramos del Arroyo Claromecó.

El arroyo posee un caudal permanente de agua con una media de $0,87 \text{ m}^3/\text{s}$. El máximo caudal se observa en primavera (septiembre y octubre) y el mínimo en invierno (junio y julio) (Carbone *et al.*, 2006).

Algunos de los usos actuales del arroyo Claromecó son:

Uso agrícola: la localidad de Tres Arroyos y alrededores, es reconocida por ser una zona “triguera” por excelencia. Todos los años se realiza la Fiesta Provincial del Trigo que desde el año 1.968, ha sido reconocida por decreto provincial N° 15.496 ⁽¹⁾.

Uso ganadero: a lo largo del arroyo existe la cría extensiva de ganado vacuno y la de subsistencia de corral (cerdos, gallinas y caballos).

Uso recreativo: El arroyo Claromecó es conocido por los amantes de la naturaleza como un lugar ideal para el avistaje de fauna, debido a la gran diversidad de mamíferos y aves que allí habitan. Se observan coipos, carpinchos, zorros, mulitas, peludos, patos, cisnes, loros barranqueros, golondrinas, entre muchos otros. Durante el verano es común observar a turistas pescando numerosas especies de peces como bagres, dientudos, chanchitas, lisas, carpas y hasta lenguados que llegan a desovar a la desembocadura del arroyo. Los cangrejos que solían convivir con los lugareños se hicieron cada vez menos frecuentes debido a la extracción de los niños que hallan en ellos un gran entretenimiento. Por otra parte, en la época estival empezaron a hacerse conocidos los deportes acuáticos relacionados con el canotaje y el rafting. El tráfico vehicular y la cantidad de gente que visita dicho arroyo durante los meses más concurridos hacen imposible la tranquilidad del lugar y por ende repercute en la biodiversidad.

Pesca de subsistencia y artesanal: en la desembocadura del arroyo existen numerosas embarcaciones pesqueras artesanales que proveen de pescado a dicha localidad y abastecen a otras como Tres Arroyos y Mar del Plata. Asimismo, los lugareños suelen utilizar el arroyo durante la época invernal para la pesca consumiendo peces como bagres, carpas, lisas, dientudos y lenguados.

Basural a cielo abierto: a la altura de la cascada N° 5 existe un basural a cielo abierto. Allí se almacenan los residuos urbanos durante la época estival cuando la central de Bellocq queda superada por la cantidad de residuos producidos por los turistas durante los meses de enero y febrero.

Tráfico vehicular: en la desembocadura del arroyo está permitida la entrada de vehículos. El tráfico masivo en la zona intermareal y sistema de dunas compacta las arenas finas y gruesas.

1) <http://www.tresarroyosturismo.com/tres-arroyos/>

Esto afecta a una gran diversidad de organismos macroscópicos y microscópicos que allí habitan como crustáceos, caracoles, almejas, berberechos, gusanos, entre otros. Cabe resaltar que los mismos son la fuente de alimento de numerosas aves costeras y marinas. Muchas de estas aves, como chorlos y gaviotines se encuentran en peligro de extinción y llegan todos los años desde América del Norte a estas playas a alimentarse, descansar y reproducirse. La compactación del suelo y el estrés generado por el tránsito vehicular, sumado a la contaminación por hidrocarburos y pesticidas, hacen del intermareal una zona incompatible con la supervivencia de la biodiversidad. La compactación de la arena afecta la alimentación y respiración de los invertebrados, mientras que de modo indirecto a la fauna que se alimenta de los mismos. El tránsito, el ruido y la cantidad de turistas en el verano pueden resultar en factores estresantes para las aves, afectando sus patrones de distribución y reproducción. Finalmente, dependiendo de la intensidad del tránsito de vehículos, la compactación de la arena puede ser un importante factor de degradación del sistema costero, afectando la infiltración del agua de lluvia en los espacios interdunares hacia las napas, y generando remoción de arena por el agua de escorrentía proveniente de instalaciones urbanas, agua de lluvia, etc. Fenómenos de erosión, contaminación, deterioro de acuíferos, depredación de recursos acuáticos entre otros, ponen en peligro el sustento económico y la salud de muchas de las poblaciones costeras de Buenos Aires, donde el turismo es una importante fuente de ingresos (Barragán Muñoz *et al.*, 2003; Dadón y Matteucci, 2006).

Urbanización: la expansión de la urbanización debe ser compatible con el medio ambiente costero, ya que sin una planificación adecuada se generan efectos nocivos sobre éste. Cuando se reducen, destruyen o inmovilizan los médanos, que naturalmente actúan como reservorios de arena, cuando se ubican caminos y/o edificios cerca de la línea de retroceso de la costa, cuando se construyen bajadas artificiales o se invierten las líneas de drenaje llevando el agua de lluvia hacia el mar, se produce el aumento de la erosión de las costas que impiden la recarga natural de los acuíferos (Dadón y Matteucci, 2006). Otros conflictos que se relacionan con la urbanización son: la privatización del dominio público, la erosión costera provocada por la inadecuada o inexistente planificación urbana, la sobreexplotación de los recursos naturales, la fragmentación de hábitats naturales ocasionando la pérdida de biodiversidad, entre otros (Barragán Muñoz *et al.*, 2003).

II.1.3. Economía de la zona

La localidad de Tres Arroyos cuenta con una población de 58.179 habitantes (INDEC, 2010). Su economía se basa principalmente en la agricultura, aunque también se observa ganadería intensiva y extensiva y los bovinos de leche. La actividad industrial se concentra en un parque creado por decreto provincial en el año 1975. En el año 2009 sus 92 hectáreas originales pasaron a ser 132 con la instalación de 39 empresas. Dicho parque industrial puede observarse desde la ruta nacional N°3 km 496 y se ubica en el centro de uno de los más importantes polos agrícolas de la provincia de Buenos Aires con producción especialmente triguera. Su localización es estratégica desde el punto de vista productivo, ya que existe una comunicación directa con otras ciudades cabeceras del interior de la Provincia y con ciudades portuarias como Bahía Blanca o Necochea ⁽²⁾.

La superficie del partido de Tres Arroyos es de 596.288 has. En la localidad cabecera se concentra el 80% de la población y se desarrollan alrededor de 700 explotaciones agropecuarias ⁽²⁾.

En lo referente a la ganadería el partido cuenta con alrededor de 248.000 cabezas de ganado bovino, con 36.500 ovinos y 4.300 porcinos. Por otra parte, existe una importante producción de miel con 200 productores que operan alrededor de 40.000 colmenas ⁽²⁾.

En el Parque industrial existen empresas relacionadas con el procesamiento y almacenamiento de cereales, con la producción de biodiesel, con la fabricación de implementos agrícolas, apícolas, acoplados, tolvas, hormigón, pisos, baldosas, fundiciones de bronce, productos químicos, de nutrición animal y uso veterinario, de extracción y procesado de miel y la fabricación de cerveza Quilmes. Existen 52 pequeñas y medianas industrias metalmecánicas que producen maquinarias e implementos agrícolas, y productos para el procesado, almacenamiento y transporte de granos. También existen 22 empresas que elaboran alimentos a base de cereales y carnes producidos en este distrito de Tres Arroyos y en los distritos vecinos, lo que agrega un alto valor a la producción primaria regional ⁽²⁾.

(2) <http://www.parqueindustrial3a.com.ar/origendelparque.html>

Con respecto a los servicios, adquieren un gran desarrollo los relacionados al comercio de granos: el sector transporte, limpieza, clasificación y almacenamiento de granos. Asimismo, en Tres Arroyos hay 10 bancos y dos compañías de seguros ⁽²⁾.

En relación a la agricultura en las Figuras II.4 y II.5 pueden observarse las superficies sembradas (ha) y las toneladas producidas por los principales cultivos de la zona. Se observa que la tendencia es creciente para la soja y la cebada cervecera, mientras que el trigo y el maíz vienen en descenso. El girasol, alpiste, avena y colza se mantienen aproximadamente constante.

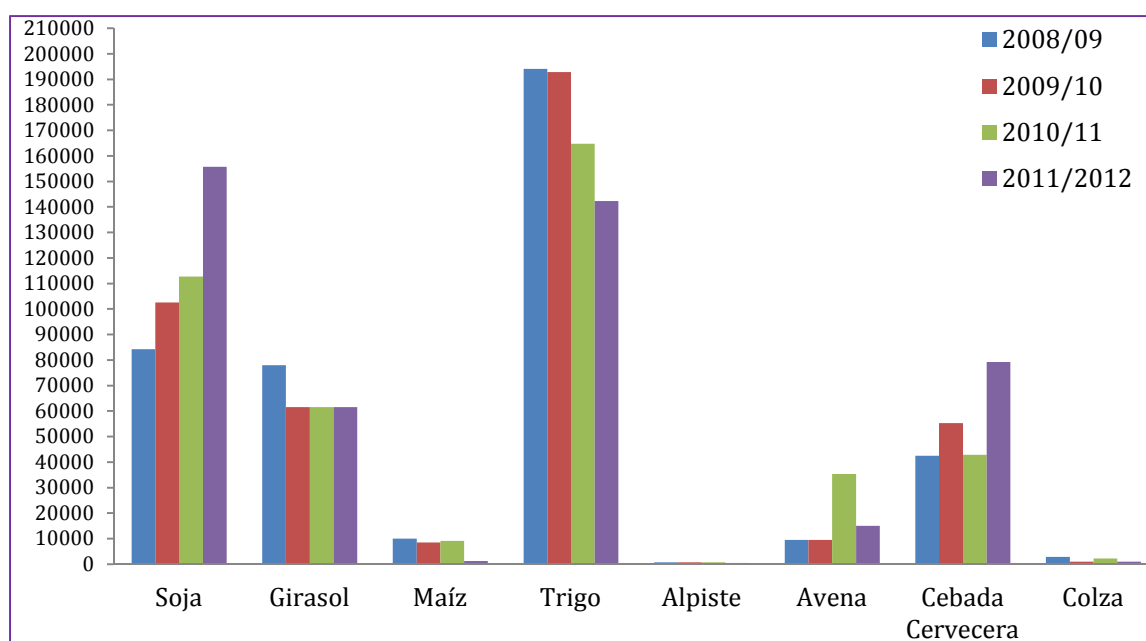


Figura II.4. Se observan las superficies sembradas (Ha) de los principales cultivos de la zona de Tres Arroyos. Elaboración propia a partir de los valores proporcionados por el SIIA (Sistema Integrado de Información Agropecuaria, 2012).

(2) <http://www.parqueindustrial3a.com.ar/origendelparque.html>

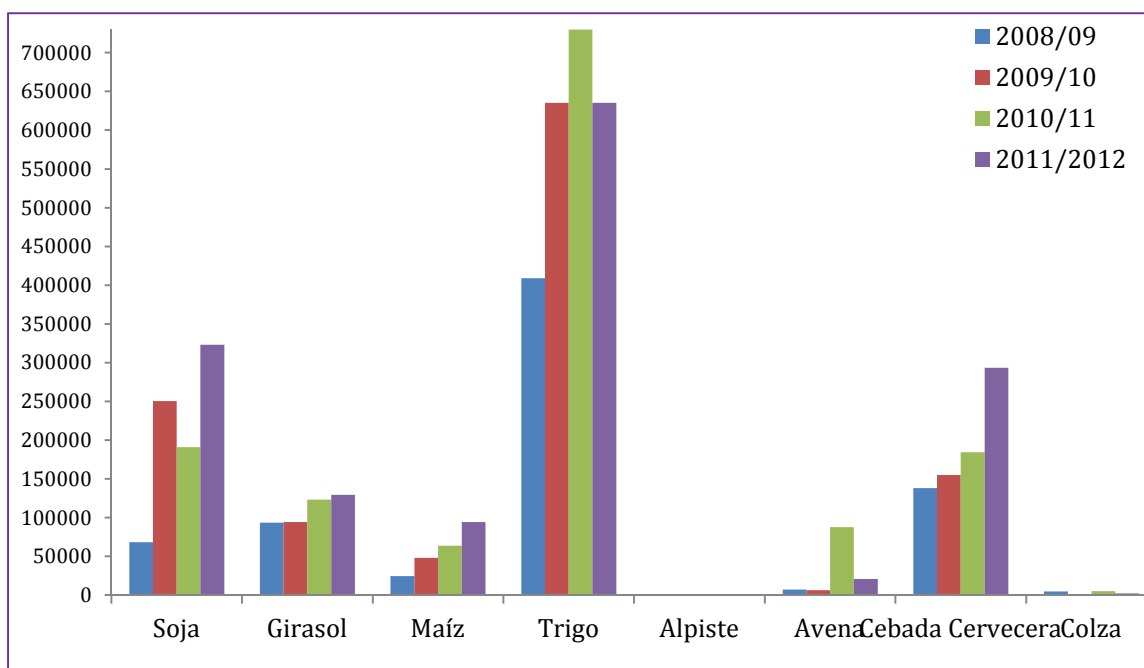


Figura II.5. Se observan las toneladas producidas de los principales cultivos de la zona de Tres Arroyos. Elaboración propia a partir de los valores proporcionados por el SIIA.

En el invierno predomina la producción de cereales como el trigo, la cebada cervecera, la avena, el girasol, la colza y en ciertos sectores el sorgo. En el verano se cultiva el maíz y la soja de 1 y 2 (Figura II. 6).

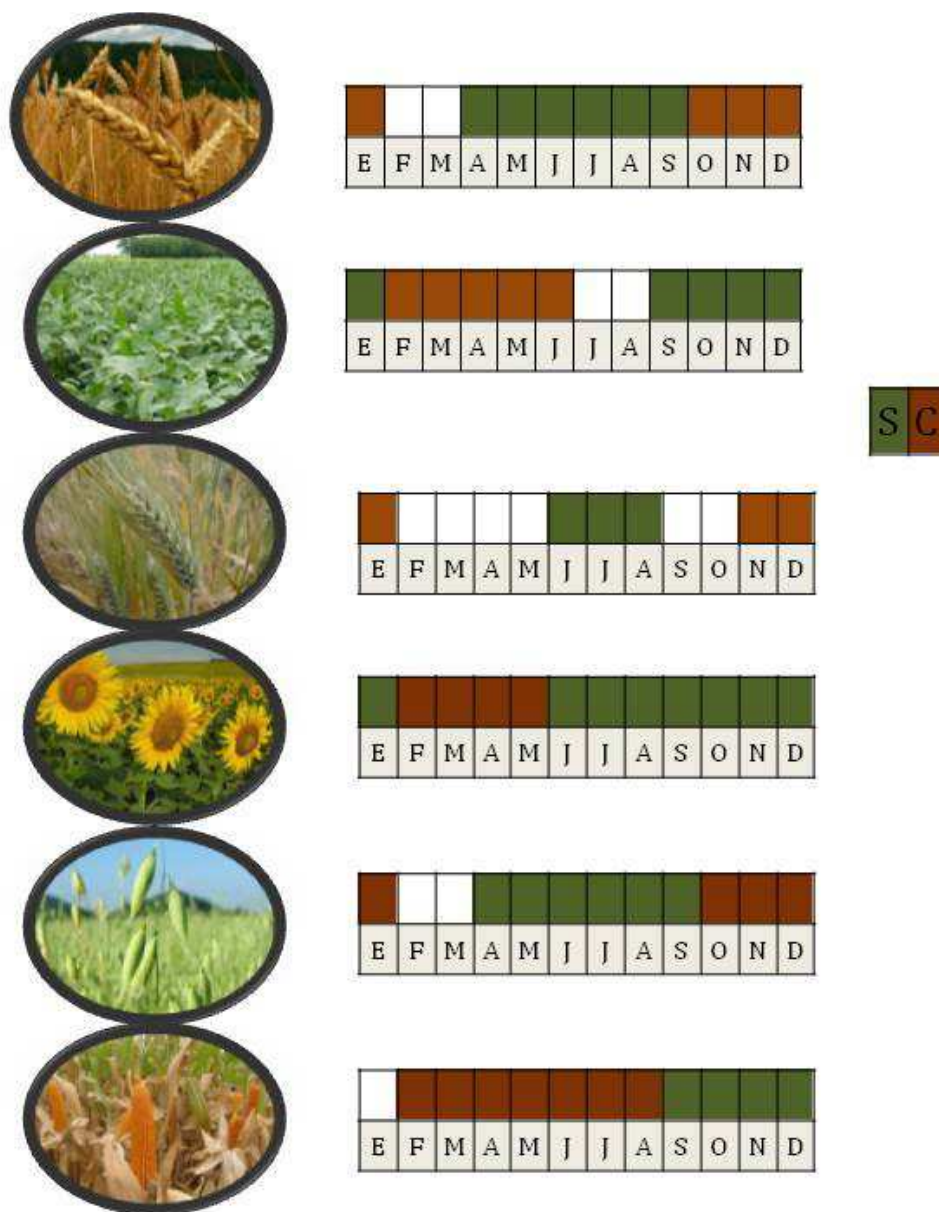


Figura II.6. Imagen que muestra los meses de siembra y cosecha para los principales cultivos de Tres Arroyos. Referencias: S: siembra; C: cosecha. De arriba hacia abajo se observan: el trigo, la soja, la cebada cervecera, el girasol, la avena y el trigo.

II.1.4. Plaguicidas utilizados en el control de plagas de los principales cultivos

En la tabla II.1 se observan los principios activos de los insecticidas utilizados en los cultivos de cereales, soja, girasol y maíz sugeridos por la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE, 2011). En nuestra zona de estudio los más utilizados en la última campaña del 2011-2012 fueron: el clorpirifos, la cipermetrina, el dimetoato y la Lambdacialotrina. Esta información fue suministrada por varios asesores de la zona.

En relación a los herbicidas los que más se aplicaron en la zona de Tres Arroyos fueron: el glifosato, el 2,4-D (éster butílico) selectivo para cereales de invierno, y el dicamba (sal dimetilamina del ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico) selectivo para cereales, mata lo que no controla el 2,4D y normalmente se usan juntos.

Tabla II.1. Principales insecticidas aplicados en los cultivos de cereales, soja, girasol y maíz. Elaboración propia con datos de CASAFE (2011).

	Cereales	Soja	Girasol	maíz
Carbamatos				
Aldicarb	✓			
Benfuracarb				✓
Benomil	✓			
Butilato			✓	✓
Carbaryl	✓	✓	✓	✓
Carbendazim	✓	✓		✓
Carbofuran	✓	✓	✓	✓
Mancozeb	✓	✓		✓
Metiocarb			✓	
Metomil	✓	✓	✓	✓
Pirimicarb	✓	✓		✓
Pyraclostrobin	✓	✓		✓
Thiodicarb		✓	✓	✓
Tiram	✓	✓	✓	✓
Piretroides				
Bifentrin				✓
Ciflutrina	✓	✓	✓	

Cipermetrina	✓	✓	✓	✓
Deltametrina	✓	✓	✓	✓
Esfenvalerato		✓	✓	
Fenpropatrina			✓	
Fenvalerato		✓	✓	
Gamma cialotrina		✓	✓	✓
Lambdacialotrina	✓	✓	✓	✓
Permetrina	✓	✓	✓	✓
Teflutrina	✓	✓	✓	✓
Zetametrina		✓	✓	✓
Fosforados				
Acefato	✓	✓	✓	✓
Clorpirifos	✓	✓	✓	✓
Dimetoato	✓	✓		
Etion		✓		
Fenitrothion	✓	✓	✓	
Fentoato	✓	✓	✓	
Mercaptotion	✓		✓	
Metamidofos		✓	✓	
Oxidemeton metil	✓			
Piridafention				✓
Profenofos		✓	✓	
Triazofos		✓		
Triclorfon			✓	✓

II.1.5. Área de estudio

Como ya se mencionó anteriormente, este estudio se llevó a cabo en las localidades de Tres Arroyos y Claromecó, partido de Tres Arroyos, provincia de Buenos Aires. La distancia desde la Capital Federal hasta la localidad de Tres Arroyos es de 583 km por la Ruta Nacional N°3 (Figura II.7). Luego por la Ruta Nacional N°73 se accede a la localidad balnearia de Claromecó, cuya distancia es de 69 km (Figura II.8).



Figura II.7. Imagen satelital que muestra la distancia por la Ruta Nacional N° 3 desde Buenos Aires hasta la localidad de Tres Arroyos, provincia de Buenos Aires (Fuente: <https://maps.google.com/>).



Figura II.8. Imagen satelital que muestra la distancia por la Ruta Nacional N° 73 desde la localidad de Tres Arroyos hasta Claromecó (Fuente: <https://maps.google.com/>).

Las muestras de agua y sedimento fueron colectadas en los arroyos 1 ($38^{\circ} 23,197' S$, $60^{\circ} 15,452' O$ o 38°), 2 ($23,011' S$, $60^{\circ} 14,844' O$) y 3 ($38^{\circ} 26,008' S$, $60^{\circ} 18,702' O$) de la localidad de Tres Arroyos (Figura II.9 y II.10) y en el Arroyo Claromecó, en su inicio ($3^{\circ} 46,833' S$, $60^{\circ} 6,747' O$) y desembocadura ($38^{\circ} 51,52' S$, $60^{\circ} 4,943' O$) (Figura II.11). En la Figura II.12 se observa un acercamiento de la desembocadura del arroyo Claromecó.



Figura II.9. Imagen satelital que muestra la ubicación geográfica de los arroyos 1, 2 y 3 de la localidad de Tres Arroyos, provincia de Buenos Aires (Fuente: <https://maps.google.com/>).



Figura II.10. Fotografía de tramos de los arroyos 1, 2 y 3 en las que se observan los sitios en donde fueron recolectadas las muestras en la localidad de Tres Arroyos.



Figura II.11. Imagen satelital en la que se observan los sitios en donde se han tomado las muestras en la localidad balnearia de Claromecó (Fuente: <https://maps.google.com/>).



Figura II.12. Imagen satelital del tramo de la desembocadura del arroyo Claromecó (Fuente: <https://maps.google.com/>).

II.2. REFERENCIAS

Barragán Muñoz J.M., Dadon J.R., Matteuci S.D., Morello J.H., Baxendale C., Rodriguez A. (2003) Preliminary Basis for an Integrated Management Program for the Coastal Zone of Argentina. *Coastal Management*, 31 (1).

Bértola G.R., Cortizo L.C., Isla F.I. (2009) Dinámica litoral de la costa de Tres Arroyos y San Cayetano, Buenos Aires. *Rev. Asoc. Geol. Arg.*, 64 (4): 657-671.

Carbone M.E., Pérez D.E., Piccolo M.C., Perillo G.M.E. (2006) Comportamiento hidrológico del arroyo Claromeco, Argentina. *Investigaciones Geográficas, Universidad de Alicante*, 39: 179 – 179.

CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, 2011) Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. Tomo I y II, 15^{ed}.

Cortizo L.C., Isla F.I. (2007) Evolución y dinámica de la barrera medanosa entre los arroyos Zabala y Claromecó, partidos de San Cayetano y Tres Arroyos, Buenos Aires. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 62 (1): 03-12.

Dadon J.R., Matteucci S.D. (2006) Caracterización de las grandes regiones costeras argentinas. *Manual de Manejo Costero para la Provincia de Buenos Aires* (F. I. Isla y C. A. Lasta, ed.). Universidad Nacional de Mar del Plata – IDRC – EUDEM.

García Martínez B., Carbone M.E., Piccolo C., Perillo G.M.E. (2008) Incidencia de la variabilidad hidrológica en la morfología de cauces del Arroyo Claromecó (Buenos Aires, Argentina). *Geographica*, 54: 61-83.

SIIA (Sistema Integrado de Información Agropecuaria, 2012)

<http://www.siia.gov.ar/>

Viglizzo E.F., Lértora F., Pordomingo A.J., Bernardos J.N., Roberto Z.E., Del Valle H. (2001) Ecological lessons and applications from one century of low external-input farming in the pampas of Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 83: 65–81.

Viglizzo E.F., Ricard M.F., Jobbágy E.G., Frank F.C., Carreño L.V. (2011) Assessing the cross-scale impact of 50 years of agricultural transformation in Argentina. *Field Crops Research*, 124: 186–194.

-CAPÍTULO 4-

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATOS Y FOSFATOS EN MUESTRAS DE AGUA DEL PARTIDO DE TRES ARROYOS

4.1. INTRODUCCIÓN

La historia agrícola de la Argentina es corta y la mayoría de los suelos fueron arados por primera vez hace alrededor de 120 años por los inmigrantes europeos. Debido a tan corta historia, a la alta fertilidad natural de los suelos y a la relación de precios económicamente desfavorable, la fertilización fue una práctica poco común en la región hasta hace poco más de 10 años (Rimski-Korsakov *et al*, 2004). La región pampeana Argentina es una de las principales áreas de producción agrícola del mundo y la fertilidad natural de sus suelos ha permitido sostener la producción agrícola-ganadera durante varias décadas con un muy bajo uso de fertilizantes.

La agricultura en nuestro país tuvo una importante expansión en los últimos 50 años desde la Pampa hacia el noroeste y noreste, a expensas de bosques y pastizales naturales (Viglizzo *et al*, 2011). En paralelo, la productividad aumentó en respuesta a la aplicación de productos fitosanitarios, la tecnología moderna y las prácticas de gestión (Satorre, 2005).

La agriculturización intensiva condujo a que los ecosistemas terrestres estén cada vez más fragmentados y los acuáticos drenados o convertidos en sistemas hipertróficos altamente turbios (Quirós *et al*, 2006).

La introducción del cultivo de soja en la Pampa Ondulada marcó un cambio en los modelos de uso agropecuario adoptados hasta entonces, caracterizado por una paulatina disminución de la

actividad ganadera en detrimento del doble cultivo trigo-soja. Entre los principales cambios estructurales y funcionales introducidos por este nuevo modelo productivo cabe mencionar: un aumento de la intensidad de laboreo del suelo, un incremento en el uso de plaguicidas y un manejo diferente de los residuos de cosecha (siembra directa). La siembra directa aminoró el daño al suelo disminuyendo la erosión, pero produjo cambios en el ambiente edáfico (menor temperatura y mayor compactación) que terminaron afectando el desarrollo inicial de los cultivos por una menor disponibilidad de nitrógeno (Heredia, 2010).

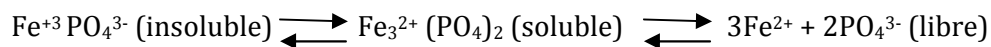
En la actualidad, alrededor del 72% del área cultivada con cultivos extensivos del país: soja, maíz, trigo, cebada, girasol y sorgo, recibe el ingreso de fertilizantes. En la campaña de 2012/2013 se aplicaron unas 2.634.395 toneladas, principalmente de compuestos nitrogenados y fosfatados (Fertilizar, 2014). La consecuente disminución de la disponibilidad de nutrientes en los suelos, combinado con el creciente nivel productivo de los cultivos, determinaron la aparición de deficiencias nutricionales, como son el nitrógeno (N), el fósforo (P) y el azufre (S). Si bien estos últimos son los más deficientes, desde mediados de la década del 90' han empezado a faltar diversos micronutrientes (García, 2002; Torri *et al.*, 2010).

Los nitratos actualmente constituyen una de las principales fuentes de contaminación difusa de las aguas superficiales y subterráneas (Reynolds Vargas y Richter, 1995; Hooda *et al.*, 1997; Honisch *et al.*, 2002; Rimski-Korsakov *et al.*, 2004). Las actividades humanas han alterado el ciclo del nitrógeno en los suelos, los sistemas acuáticos y la atmósfera (Howarth *et al.*, 1996; Molenat *et al.*, 2008). La agricultura, la deposición atmosférica, los efluentes descartados desde las poblaciones humanas (Howarth *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2001), la mala disposición de la basura (Jones *et al.*, 2001), la utilización de estiércol en los campos cultivados (Liu *et al.*, 2005; Rosso y Fernández Cirelli, 2012), la fijación de nitrógeno atmosférico por los cultivos (Castillo, 2010) son algunos de los factores que influyen en la cantidad de nitrógeno liberado al ambiente. El flujo de nitrato y su concentración son controlados por procesos hidrológicos, relacionados con las trayectorias del flujo de agua, y por procesos del ciclo de nitrógeno (absorción de la planta por las raíces, mineralización, nitrificación y desnitrificación) o más a menudo, por la interacción de ambos (Molenat *et al.*, 2008). En general, las zonas agrícolas se caracterizan por una entrada mucho mayor de nitrógeno orgánico y/o mineral por fertilización que por la deposición de nitrógeno atmosférico, aunque éste último puede ser de importancia en algunos casos (Jones *et al.*, 2001; Molenat *et al.*, 2008). Cuando el nitrógeno aplicado supera la demanda del cultivo, el exceso se mueve principalmente como nitrato

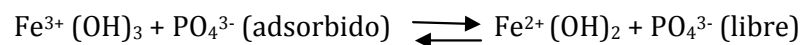
que con eventos de lluvias intensas aumentan su probabilidad de lixiviación y de escorrentía hacia los cuerpos de agua (Molenat *et al.*, 2008). Otros factores que afectan a la lixiviación de nitrógeno son la distribución del tamaño de partícula, la porosidad del suelo, y la ocurrencia de canales de riego debido a que modifican el escurrimiento normal del agua en los suelos (Rimski-Korsakov *et al.*, 2004).

El fósforo es también uno de los contaminantes más frecuentes en las aguas superficiales. Sus fuentes son variadas ya que puede provenir del uso de fertilizantes desde los campos cultivados, de la descomposición de materia orgánica, de los desechos animales (Nash y Halliwell, 2000), de los vertidos procedentes de los centros urbanos y del uso de detergentes que poseen fósforo (Castillo, 2010). La capacidad de retención de fósforo en el suelo se produce tanto por procesos bióticos como abióticos. Los microorganismos lo transforman de formas orgánicas a inorgánicas y viceversa. Los procesos abióticos son procesos de disolución, adsorción y precipitación (Quintero *et al.*, 1996; Yin y Liang, 2013). La capacidad de retener fósforo desde el suelo es limitada y cuando éste se satura, la concentración de fósforo en el agua de poro aumenta, y por ende la probabilidad de ser movilizado hacia los cuerpos de agua superficiales (Nash y Halliwell, 2000; Yin y Liang, 2013). Actualmente se admite que existen, al menos, tres mecanismos de transferencia de fosfato desde el suelo a los sistemas acuáticos: disolución y movimiento en forma soluble; transporte de formas adsorbidas, asociado al desplazamiento vertical de la fracción coloidal y, sobre todo, a los materiales erosionados; y, por último, pérdidas directas de fertilizante cuando llueve tras la aplicación del mismo (Sande *et al.*, 2005).

Vila Pinto (2003) señala que la liberación de fósforo de los sedimentos depende principalmente de la cantidad de oxígeno en la interfase sólido-líquido. Los sedimentos están conformados por partículas pequeñas separadas por espacios intersticiales llenos de líquido o agua de poro. La interfase sedimento-agua es la barrera al intercambio libre de fósforo entre los sedimentos y la columna de agua. Si esta interfase está anóxica, los iones fosfatos pueden difundir a una tasa dependiente del gradiente de concentración entre el agua de poro y el agua de la columna. Si la interfase está oxigenada, los iones fosfatos precipitan y no difunden. Sedimentos anóxicos liberan fósforo hasta 1.000 veces más que los óxicos y donde:



Y aún más importante es la reacción:



El hidróxido férrico puede ser reemplazado por otros adsorbentes como arcillas. El equilibrio de adsorción está dado en esta zona por el pH, el potencial redox y la cantidad de O_2 . Las reacciones más importantes de la interfase son aquellas que modifican el fósforo desde la fase sólida a fosfato soluble, desde donde puede ser liberado a la columna de agua. La cantidad de arcillas en los sedimentos son un factor importante para determinar la capacidad de retención de fósforo. Las arcillas son una combinación de silicatos complejos de aluminio y hierro y sus óxidos, y adsorben fósforo por la interacción entre el PO_4^{3-} y el Al^{3+} . Por otra parte, el fósforo orgánico liberado por los organismos en descomposición modifica aún más la cantidad de fósforo en el agua de poro. La actividad biológica de los sedimentos es una fuente importante de animales detritívoros tales como larvas de insectos, gusanos, moluscos y crustáceos. Estos organismos excretan compuestos solubles de fósforo en el agua de poro mientras excavan y se alimentan en los primeros centímetros del sedimento. Las algas, macrófitas y zooplankton liberan fósforo al descomponerse, lo que contribuye aún más a la cantidad de fósforo en los sedimentos (Vila Pinto, 2003).

Los nutrientes transportados por los ríos tienen un profundo efecto en la calidad del agua, la condición del hábitat y el estado trófico de los ecosistemas acuáticos. En los arroyos, el aumento de los aportes de nutrientes puede aumentar el crecimiento de algas y conducir a la hipoxia, alterando la estructura de las redes tróficas y afectando los servicios ambientales, tales como el suministro de agua y la recreación (Dodds, 2006; Mallin *et al.*, 2006). Ciertas variables como la cobertura vegetal, la geología y la topografía de la cuenca también pueden influir en la carga de nutrientes que llega a las aguas superficiales (Castillo, 2010).

En Argentina existen numerosos estudios que relacionan la contaminación por nutrientes, nitratos y fosfatos, y su efecto en los cuerpos de agua superficiales (Mariazzi *et al.*, 1988; Viglizzo *et al.*, 2001; Quiros *et al.*, 2002a, 2002b; Rimski-Korsakov, 2004; Viglizzo *et al.*, 2005; Quiros *et al.*, 2006; Viglizzo *et al.*, 2011; Rosso y Fernández Cirelli, 2012) pero no existen estudios que relacionen esta contaminación con las actividades agropecuarias y la aplicación de productos fitosanitarios en la zona de Tres Arroyos y Claromecó. Por tal motivo, analizamos la variación espacial y temporal de la concentración de nitratos y fosfatos durante los cultivos de invierno y verano, para entender

cómo el uso del suelo impacta en los cuerpos de agua aledaños a los campos cultivados de dicha zona.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Muestras de agua

Se realizaron seis campañas de muestreo: en junio/diciembre de 2009, mayo/diciembre de 2010, noviembre de 2011 y abril/mayo de 2012 y se agruparon las muestras en cultivos de invierno y primavera/verano (Tablas 4.2 y 4.3). En el caso de la campaña de verano de 2011 solo se tomaron muestras de agua en el arroyo 3 de tres arroyos e inicio y desembocadura del arroyo Claromecó. Desde abril predominan el trigo, la cebada, el girasol, el sorgo, la avena y el alpiste y desde septiembre la soja y el maíz (Figura II.6).

4.2.1.1. Análisis de parámetros químicos in situ

En cada uno de los arroyos se determinó el pH, la conductividad (mS/cm), los sólidos totales disueltos (ppm) y la temperatura (°C) con un conductímetro Hanna field Combo pH & EC model HI 98.129. Se recolectaron muestras de agua de los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos y del inicio y la desembocadura del arroyo Claromecó (Figura II.9 Y II.11). Las mismas se colectaron en envases de plástico de 250 ml y se refrigeraron a 4 °C para el posterior análisis de nutrientes.

4.2.1.2. Determinación de nutrientes

Para la determinación de nutrientes el agua fue filtrada con una jeringa de 20 centímetros cúbicos de vidrio neutro térmico, con filtros Micron Separation Inc. 25 mm nylon syringe filter de 0,45 µm, PK/ 100.

El análisis se llevo a cabo con un colorímetro Hach Dr/890 previamente calibrado con soluciones patrón de concentración conocida. Se utilizaron los métodos 8.114 para la determinación de ortofosfato y el 8.039 para la determinación de nitratos.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la zona de estudio se utilizan como fuente de nitrógeno y fósforo para fertilización, el fosfato diamónico cuya composición es 18% de nitrógeno amoniacal, 18% de fósforo P_2O_5 y 46% de nitrato y la urea con 46% de nitrógeno y el superfosfato con 46% de fósforo (información suministrada por asesores de la zona).

Las precipitaciones registradas en el partido de Tres Arroyos para las seis campañas realizadas se observan en las Figuras 4.1, 4.2 y 4.3. También se observa en la tabla 4.1 las propiedades de los suelos utilizados en este estudio.

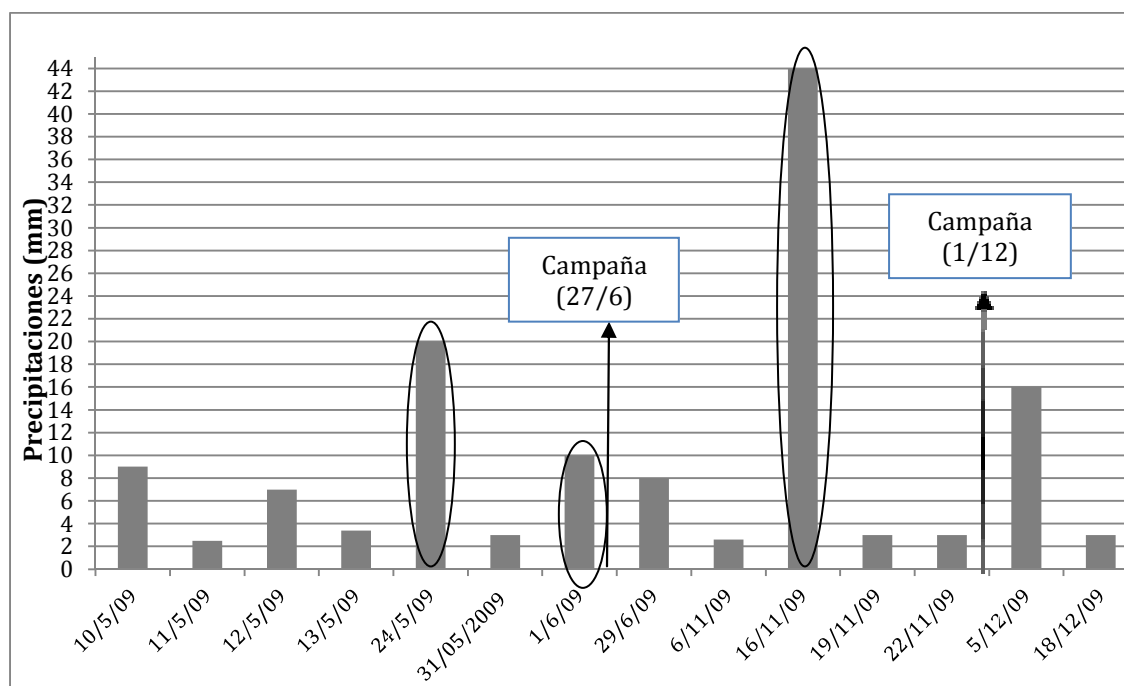


Figura 4.1. Precipitaciones (mm) registradas en los meses de mayo y noviembre de 2009. Con círculos se observan las mayores precipitaciones (Fuente: Servicio Meteorológico Nacional).

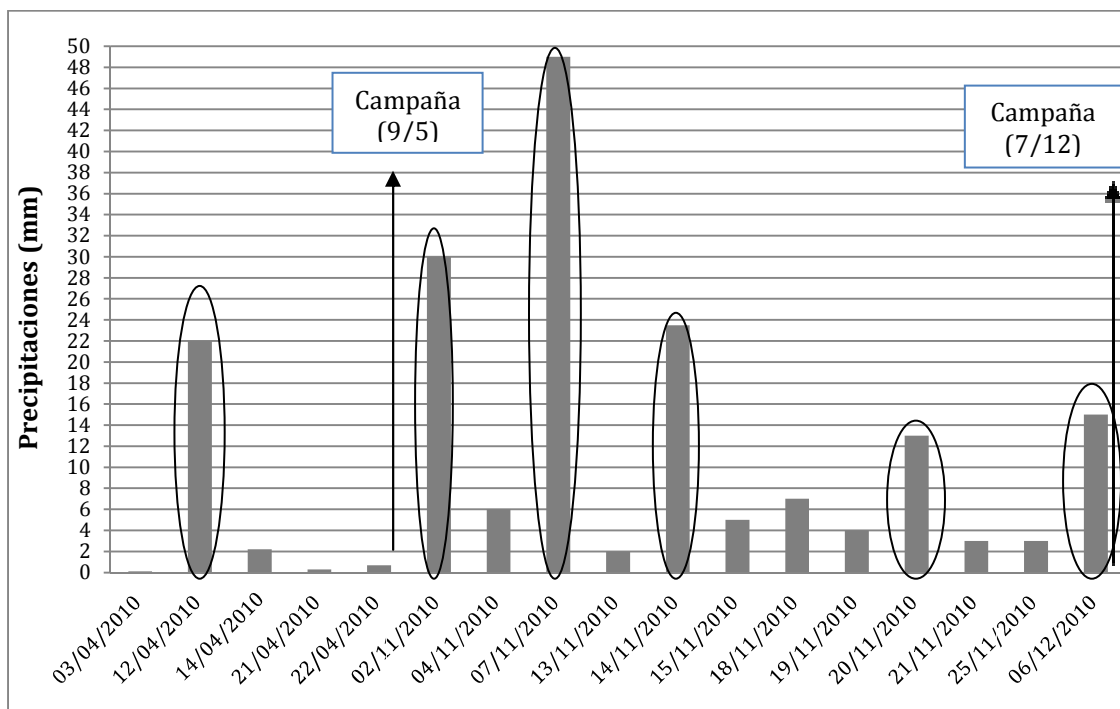


Figura 4.2. Precipitaciones (mm) registradas en los meses de abril y noviembre de 2010. Con círculos se observan las mayores precipitaciones (Fuente: Servicio Meteorológico Nacional).

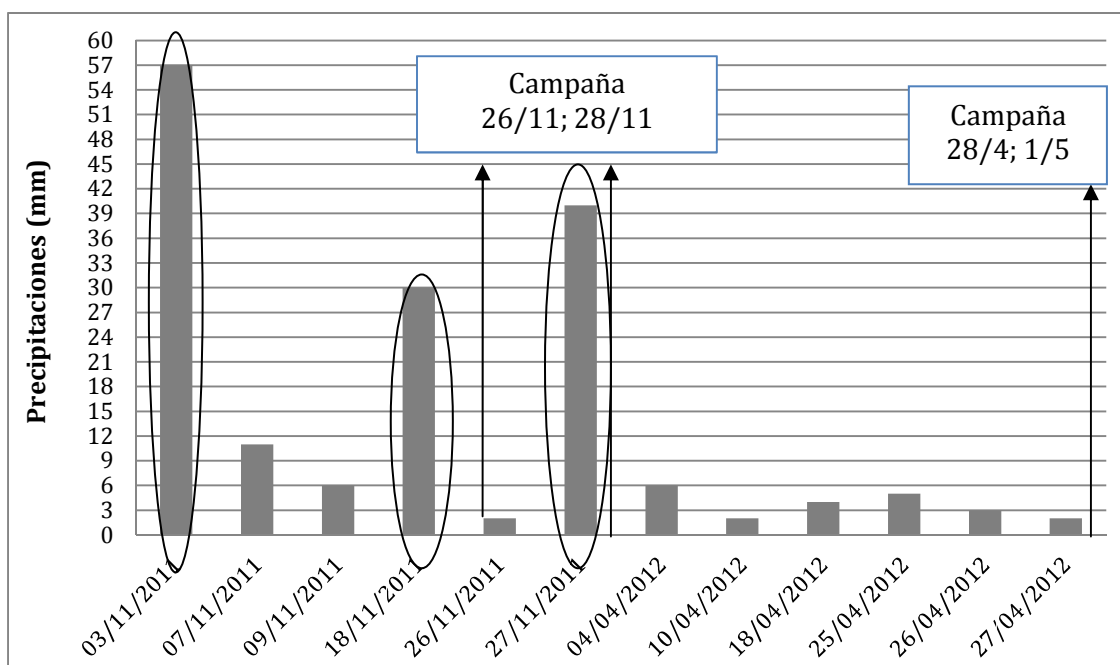


Figura 4.3. Precipitaciones (mm) registradas en los meses de noviembre de 2011 y abril de 2012. Con círculos se observan las mayores precipitaciones (Fuente: Servicio Meteorológico Nacional).

Tabla 4.1. Características de los suelos circundantes a los arroyos muestreados (Análisis realizado por el grupo de suelos de la cátedra de Agronomía, UBA). Referencias: % de materia orgánica (% MO), % Carbono (% C), % Nitrógeno (% N), Fósforo (P), Conductividad Eléctrica (CE), Arcilla (Ar), Limo (L) y Arena (A).

Estación de Muestreo	% MO	% C	% N	Rel. C/N	ppm P	pH	CE (ds/m)	% Ar	% L	% A	Clase Textural
A° 1	0,64	0,32	0,040	8,00	9,74	8,92	0,61	20	28	52	Franco Arenosa
A° 2	1,26	0,63	0,050	12,60	12	8,53	0,52	12,50	37,50	50	Franco
A° 3	0,96	0,48	0,050	9,60	10,30	8,06	0,78	12,50	35,50	52	Franco Arenosa
Arroyo Claromecó (I)	0,86	0,43	0,050	8,60	5,21	9,04	0,82	10	20	70	Franco Arenosa
Arroyo Claromecó (D)	0,64	0,32	0,040	8	6,50	9,14	0,54	7,50	20,50	72	Franco Arenosa

En este análisis de los cuerpos de agua superficiales se consideraron los parámetros fisicoquímicos y los nutrientes debido a su incidencia directa sobre la biota y la productividad de los mismos. Los valores que se describen en las Tablas 4.2 y 4.3 son los hallados en otoño-invierno y primavera-verano para los cinco sitios de muestreo (A° 1, 2 y 3 e I y D). Los datos se describen de esta manera debido a que la aplicación de productos fitosanitarios varía de acuerdo a si se trata de cultivos de invierno o de verano.

Las precipitaciones mensuales acumuladas fueron de: 33 mm en junio de 2009, 26 mm en mayo de 2010 y de 22 mm en abril de 2012. En los meses de primavera-verano se registraron: 52 mm en diciembre de 2009, 127 mm en diciembre de 2010 y de 146 mm en noviembre de 2011. Durante la campaña de noviembre de 2011 se registró una precipitación de 40 mm el día 27, un día antes de la toma de muestras en el arroyo Claromecó. Hasta el día 26 de noviembre las precipitaciones habían sido de 106 mm.

Tabla 4.2. Promedio \pm SD (n=2) de los parámetros físico-químicos y de nutrientes en aguas de los arroyos de Tres Arroyos y Claromecó correspondientes a los cultivos de otoño-invierno. C.E.: conductividad eléctrica. Las mediciones realizadas *in situ* poseen los siguientes errores de medición: T°C \pm 0,5; pH \pm 0,02; C.E. /Sólidos disueltos: \pm 2% f.s.

Estación de Muestreo	Día y hora	T°C	pH	C.E. (μ S/cm)	sólidos disueltos (ppm)	PO ₄ ³⁻ (mg/l)	NO ₃ -N(mg/l)
A° 1	27/06/09 (11:30)	3,5	9,15	1359	739	6,5 \pm 0,21	ND
	08/05/10 (12:00)	11	8,8	1333	696	0,9 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1
	28/4/12 (16:00)	14	8,33	1272	662	0,25 \pm 0,07	0,9 \pm 0,1
A° 2	27/06/09 (13:00)	4,9	9,19	1700	872	1,4 \pm 0,07	2,2 \pm 0,2
	08/05/10 (12:38)	13,8	8,97	1618	842	0,6 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1
	28/4/12 (15:15)	13	8,63	1347	702	0,2 \pm 0,1	1,45 \pm 0,35
A° 3	27/06/09 (14:48)	8,2	8,38	2090	1086	8,7 \pm 0,21	3,7 \pm 0,3
	08/05/10 (13:20)	12,5	8,1	1713	878	1,3 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1
	28/4/12 (15:30)	13,01	8,16	1885	994	1,15 \pm 0,07	0,75 \pm 0,21
I	25/06/09 (15:30)	6,4	8,95	2115	1108	3,3 \pm 0,2	3,6 \pm 0,3
	09/05/10 (11:35)	10,7	8,43	2012	1048	1,1 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2
	1/5/12 (11:53)	12,6	8,25	1914	995	0,9 \pm 0,1	0,65 \pm 0,07
D	25/06/09 (12:30)	8,3	8,64	>3999	>2000	4,3 \pm 0,2	2,6 \pm 0,3
	09/05/10 (14:06)	14,8	8,1	>3999	>2000	1,4 \pm 0,2	1,9 \pm 0,3
	1/5/12 (11:53)	13,4	8,23	2047	1059	0,75 \pm 0,07	1,35 \pm 0,21

Tabla 4.3 Promedio \pm SD (n=2) de los parámetros físico-químicos y de nutrientes en aguas de los arroyos de Tres Arroyos y Claromecó correspondientes a los cultivos de primavera-verano. C.E.: conductividad eléctrica. Las mediciones realizadas *in situ* poseen los siguientes errores de medición: T°C \pm 0,5; pH \pm 0,02; C.E. /Sólidos disueltos: \pm 2% f.s.

Estación de Muestreo	Día y hora	T°C	pH	C.E. (μ S/cm)	sólidos disueltos (ppm)	PO ₄ ³⁻ (mg/l)	NO ₃ -N (mg/l)
A° 1	1/12/09 (12:15)	22,7	8,54	1315	687	20,8 \pm 1,2	ND
	05/12/10 (12:50)	22	8,35	1297	673	23,05 \pm 1,20	ND
A° 2	1/12/09 (13:15)	21,8	9,32	1722	903	1,6 \pm 0,1	ND
	05/12/10 (13:30)	23,1	8,89	1550	812	2,85 \pm 0,21	0,75 \pm 0,21
A° 3	1/12/09 (15:10)	22	8,18	2086	1083	4,2 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1
	05/12/10 (14:20)	22	7,9	1307	680	12,65 \pm 0,21	1,15 \pm 0,21
	26/11/11 (14:00)	23,5	8,13	1692	879	1,55 \pm 0,07	1,55 \pm 0,78
I	02/12/09 (16:45)	20,1	8,95	2275	1184	5,0 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2
	7/12/10 (15:00)	22,1	8,4	1846	958	6,55 \pm 0,07	ND
	28/11/11 (17:30)	23,4	7,93	791	410	0,65 \pm 0,07	1,95 \pm 1,34
D	04/12/09 (11:00)	21,6	8,17	>3999	>2000	5,4 \pm 0,2	3,6 \pm 0,3
	07/12/10 (17:15)	22,8	8,2	>3999	>2000	6,55 \pm 0,07	0,85 \pm 0,21
	28/11/11 (18:45)	22,5	8,13	1696	881	1,15 \pm 0,07	1,9 \pm 1,4

Los valores de pH fueron altos (≥ 8) en todos los arroyos analizados, detectándose los mayores en el A° 2 de Tres Arroyos en invierno (junio 2009; pH=9,19) y en verano (diciembre 2009; pH=9,32). El rango de pH fue de 8,1 a 9,19 en los meses de invierno y de 7,9 a 9,32 en los de verano.

Las temperaturas variaron en un rango de 3,5 y 23,4 °C siendo menores en junio de 2009 y mayores en noviembre de 2011. La conductividad también fue alta y superó los 1.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en todos los casos. La misma presentó un rango de 1.272 a $\geq 3.900 \mu\text{S}/\text{cm}$ en los meses de otoño-invierno y de 791 a $\geq 3.900 \mu\text{S}/\text{cm}$ en los meses de primavera-verano. Los valores mínimos corresponden al A° 1 de Tres Arroyos en el primer caso y al inicio del arroyo Claromecó en el segundo. El valor máximo encontrado corresponde a la desembocadura del arroyo Claromecó, debido a que en ese sitio se produce la mezcla de agua dulce con el agua salada proveniente del Océano Atlántico.

En junio de 2009 se registraron las mayores precipitaciones acumuladas (33 mm) de los meses de otoño-invierno, que coincidieron con los mayores valores de conductividad y sólidos totales disueltos (ppm). Sin embargo, en las campañas de verano se observó el efecto inverso, observándose los menores valores en los meses en los que se registraron las mayores precipitaciones. Hubo un claro efecto de dilución en estos meses dado por la cantidad de milímetros mensuales de agua caídos, que fueron de 127 mm en diciembre de 2010, de 106 mm el 26/11/11 y de 146 el 28/11/11.

En relación a los valores de nitrato y fosfato, éstos presentaron concentraciones diferentes según el sitio de muestreo y el período de toma de muestra.

El fosfato presentó un rango de 0,2 a 8,7 mg/l en los meses de otoño-invierno y de 1,15 a 23,05 durante la primavera-verano. En las campañas de otoño-invierno se observó que las mayores concentraciones de fosfato halladas en los diferentes arroyos coincidían con las mayores precipitaciones registradas durante junio de 2009. Por otra parte, la concentración de fosfato hallado en todos los arroyos durante diciembre de 2010 fue claramente mayor al resto de las campañas de primavera-verano. En este mes las precipitaciones fueron de 127 mm, lo que sugeriría una aplicación reciente de fósforo y su entrada por escorrentía a los cuerpos de agua aledaños. Los valores más altos se midieron en el arroyo 1 y 3 de Tres Arroyos, siendo de 23,05 en el primer caso y de 12,65 mg/l en el segundo. También se observó un valor alto de fosfato de 20,8 mg/l durante diciembre de 2009 en el arroyo 1 a pesar de que las precipitaciones acumuladas fueron de 52 mm.

Finalmente, en el arroyo Claromecó las menores concentraciones se obtuvieron durante noviembre de 2011 cuando las precipitaciones fueron de 146 mm, habiéndose presentado una lluvia de 40 mm el día anterior a la toma de muestras. Este resultado podría estar mostrando un efecto de dilución en la concentración de fosfato hallado en este arroyo. Por otra parte, la

concentración de fosfato fue menor en el inicio del arroyo a pesar que durante su recorrido existen campos cultivados. En este resultado, como así también en las diferentes concentraciones halladas de los arroyos 1 y 2 de Tres Arroyos (ver sección 5.3.1.1), uno de los factores que podría estar influyendo en la cantidad de fosfato hallada, es la cantidad de materia orgánica de los suelos analizados (Tabla 4.1).

Quintero *et al.* (1996) analizaron las isotermas de fósforo que relacionan la cantidad de materia orgánica con la capacidad de absorción de este nutriente. En suelos que poseían $0,64 \pm 0,44\%$ de materia orgánica se obtuvieron los menores valores de capacidad de adsorción de fósforo; mientras que suelos con $1,96 \pm 0,58 \%$ mostraron los mayores valores de adsorción del mismo. El contenido de materia orgánica del A° 1 fue de $0,64\%$ y el del A° 2 fue de $1,26 \%$. En el caso del arroyo Claromecó los contenidos de materia orgánica fueron de $0,86\%$ en el inicio y de $0,64\%$ en la desembocadura. Nuestros resultados coinciden con los de Quintero *et al.* debido a que se observan las mayores concentraciones de fosfatos en agua en los casos en donde la capacidad de retención de los suelos es menor, dado por un menor porcentaje de materia orgánica.

Los nitratos presentaron un rango de 0 a $3,7 \text{ mg/l}$ en los meses de otoño-invierno y de 0 a $3,6$ durante la primavera-verano. No se observó una relación directa entre la cantidad de precipitaciones y la concentración de nitratos. Otros factores podrían estar afectando la movilización de los nitratos en el suelo y que no han sido analizados en este trabajo, como por ejemplo el tamaño de partícula, la porosidad del suelo (Oomen, 1995; Cameira *et al.*, 2003) o la vegetación ribereña (Giaccio, 2011).

Las mayores concentraciones de nitratos se encontraron en el mes de junio de 2009 en todos los sitios muestreados, a excepción del arroyo 1, siendo la mayor la hallada en el A° 3 con un valor de $3,7 \text{ mg/l}$. También se observó un valor alto de $3,6 \text{ mg/l}$ en la desembocadura del arroyo Claromecó durante diciembre de 2009.

Nuestros resultados no coinciden con los informados por Han *et al.* (2010) debido a que no observamos una correlación positiva entre los niveles de nitratos y el caudal de los arroyos, relacionado directamente con la cantidad de precipitaciones. De acuerdo a sus resultados existiría un efecto de concentración de los nitratos en las épocas en donde el caudal es menor.

Otros autores sugieren que cuando se analizan las concentraciones de nitrato en arroyos aledaños a zonas agrícolas en escalas de tiempo mayores a un año, el principal factor que determina la cantidad de nitrógeno en el agua es el uso del suelo, en particular la tasa de aporte de nitrógeno

desde los campos cultivados (Collins y Jenkins, 1996; Jordan *et al.*, 1997; Schilling y Libra, 2000). En este aspecto, un estudio realizado por Pekarova y Pekar (1996) dio como resultado que los valores máximos y mínimos de nitratos encontrados en el agua superficial dependían de factores como el uso de la tierra, la vegetación y la masa de nitratos acumulada en la cuenca, además de la duración del período seco, entre otros factores. Demostraron que las concentraciones de este nutriente se habían reducido como resultado de la disminución en el uso de fertilizantes nitrogenados inorgánicos. En nuestra área de estudio, y de acuerdo a la información suministrada por asesores de la zona, se usan tanto fertilizantes nitrogenados orgánicos como inorgánicos, aunque no pudimos acceder a otra información que nos permita relacionar el uso de estos fertilizantes con la cantidad hallada en los arroyos de la zona.

Los valores de nutrientes hallados en el arroyo Claromecó durante el mes de diciembre de 2009, fueron mayores a los informados por Rosso y Fernández Cirelli (2012) en la primavera de ese mismo año. Ellos informaron valores de fósforo total de 3,12 mg/l y de 1,24 mg/l de nitratos. En diciembre nuestros valores fueron de 5 mg/l de fosfato y 2 mg/l de nitrato en el inicio y de 5,4 de fosfato y 3,6 mg/l de nitrato en la desembocadura, lo que sugiere un mayor aporte de nutrientes desde los campos circundantes.

El estado del cauce y de la vegetación ribereña puede conducir a una reducción de los sedimentos y nutrientes que ingresan a los cuerpos de agua disminuyendo la escorrentía, ya sea a través de la absorción biológica, la sedimentación o la desnitrificación (Giaccio, 2001; Busse y Gunkel, 2002; Portela *et al.*, 2009).

En los arroyos de Tres Arroyos y Claromecó existe una vegetación ribereña variada compuesta de gramíneas, dicotiledóneas, arbustos y árboles. Es factible que los niveles de nitrato estén siendo controlados por la vegetación ribereña debido a que se han mantenido en concentraciones bajas en relación a los fosfatos. Giaccio (2011) ha realizado un riguroso estudio de la zona analizando diversas composiciones florísticas y ha intentado relacionarlas con la capacidad de retención de nutrientes y no ha podido arribar a una conclusión clara al respecto.

Rosso y Fernández Cirelli (2012) sugieren que los arroyos con altos niveles de fosfatos y pH y bajas concentraciones de nitratos, como los observados en nuestra zona de estudio, poseen las condiciones más desfavorables para el crecimiento de las macrófitas, debido a que a este pH no pueden obtener el CO₂ y el bicarbonato para realizar la fotosíntesis. Por ende, estas condiciones a largo plazo podrían ser perjudiciales para los ecosistemas acuáticos de la zona, sumado a que la

eutrofización puede comenzar a partir de contenidos de fósforo de 20 µg/l, por lo que el lixiviado de fosfatos desde el suelo a los sistemas acuáticos puede suponer serias consecuencias sobre los parámetros de los que depende la calidad medioambiental (Sande *et al.*, 2005).

En nuestra área de estudio, la carga de nutrientes que alcanza los cuerpos de agua sugiere la influencia de otros factores, como la cantidad de productos aplicados en los campos aledaños, las precipitaciones, los tipos de suelos, los sistemas de cultivos, las prácticas agropecuarias, la geología y la topografía del lugar (Castillo *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2010).

En relación al tipo de cultivos en la zona de Tres Arroyos y Claromecó, puede apreciarse en las figuras II.4 y II.5 que predominan la soja, el trigo y la cebada cervecera. Ciampitti y García (2008) analizaron para los cultivos de soja, maíz, girasol y trigo las miles de toneladas de fósforo y nitrógeno que son extraídas por grano para cada uno de estos cultivos. Sus resultados muestran que la soja obtiene hasta un 70% del N₂ a través de la fijación simbiótica, a diferencia del resto, principalmente el trigo que precisa de una fertilización nitrogenada para su correcto desarrollo. En el caso del fósforo, la soja es el cultivo que mayor aplicación de este nutriente requiere. Los niveles hallados de nutrientes en nuestros arroyos coinciden con los resultados de estos autores, debido a que en verano se observan mayores niveles de fosfato en los cuerpos de agua y en invierno de nitratos, coincidiendo con las aplicaciones de fertilizantes para los cultivos de soja en verano y trigo y cebada cervecera en invierno. Es claro que los cultivos regulan la dinámica de los nutrientes en el suelo, principalmente a través de la absorción por la raíz (Raun y Johnson, 1995). Macdonald *et al.* (1997), encontraron que el porcentaje de recuperación de los fertilizantes nitrogenados utilizados variaba entre 26 y 60% dependiendo de las características del sistema de la raíz, el ciclo de cultivo, las necesidades de nutrientes y las condiciones ambientales.

Por otra parte, son llamativos los altos niveles de fósforo encontrados en los arroyos 1 (20,8 y 23,05 mg/l) y 3 (12,65 mg/l) durante diciembre de 2009 y 2010. Peltzer *et al.* (2013) informan altos niveles de ortofosfato, aún más altos que los informados por nosotros, en zonas de producción de soja en la provincia de Entre Ríos. Además del fosfato aportado por el proceso de fertilización, debería tenerse en cuenta el aporte que podría provenir del uso del herbicida glifosato. Manassero *et al.* (2010) han informado aumento en los niveles de fosfato en agua al realizar estudios de degradación del herbicida. Di Fiori *et al.* (2012) han informado aumentos en los niveles de fosfato en el agua al estudiar las variaciones en las concentraciones de glifosato en acuarios ante la presencia de *Limnoperna fortunei*.

4.4. CONCLUSIONES

Nuestros resultados ponen en evidencia la dificultad de entender y predecir los factores que influyen en la cantidad de nutrientes hallada en los cuerpos de agua, dado que los agroecosistemas son sistemas extremadamente complejos y variables a lo largo de los años y las estaciones. Otros autores han expresado sus dificultades a la hora de realizar este tipo de predicciones (Molenat *et al*, 2008).

Es claro que influyen múltiples factores en la concentración de nitratos y fosfatos en los cuerpos de agua superficial como ser: el flujo de agua, los procesos del ciclo del nitrógeno y del fósforo (absorción de la planta, la mineralización, nitrificación y desnitrificación), la vegetación ribereña, los procesos biogeoquímicos, la cantidad de precipitaciones, las prácticas agrícolas inadecuadas, las propiedades fisicoquímicas y cantidad de materia orgánica de los suelos, entre otros.

Si bien en el caso particular de la localidad de Claromecó, el agua del arroyo no es utilizada como fuente de agua de consumo, riego o agua de bebida animal, el sector de Dunamar se abastece con agua de pozo. Por ende, creemos que es necesario considerar y analizar la posible contaminación del agua subterránea por nutrientes. Para tener en cuenta: la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación establece un valor ≤ 10 mg/l de nitratos + nitritos en agua de pozo consumida sin tratamiento y la bibliografía sugiere que en zonas aledañas a tierras cultivadas los valores de nitratos superan ampliamente esta norma. Wu *et al*. (1997) observaron que hasta un 50% del nitrógeno aplicado en el suelo puede lixiviar a aguas subterráneas en suelos conformados por partículas gruesas. Los sistemas agrícolas de producción actuales pueden afectar el estado hídrico de los suelos. La siembra directa es la técnica más utilizada, y si bien ésta puede disminuir la escorrentía y la evaporación del agua del suelo, puede incrementar el potencial de lixiviación debido a los canales que se forman en el perfil del suelo (Peterson y Power, 1991; Drury *et al*, 1993).

Las concentraciones de fósforo en los arroyos de Tres Arroyos muestran que otros factores además de la fertilización pueden estar afectando los niveles de este nutriente como ser la degradación del pesticida glifosato.

Es necesario que se produzcan cambios en los sistemas agrícolas para reducir las cargas de nutrientes en las aguas superficiales y subterráneas por escorrentía o lixiviación. Cada elección tiene que adaptarse a las condiciones del lugar y considerar los riesgos ambientales. Es importante distinguir entre los suelos sensibles a la lixiviación y los sensibles a la erosión (Honish *et al.*, 2002) para disminuir los daños ambientales en los ecosistemas acuáticos.

4.5. REFERENCIAS

Busse L., Gunkel G. (2002) Riparian alder fens – source or sink for nutrients and dissolved organic carbon? – 2. Major sources and sinks. *Limnologia*, 32: 44–53.

Cameira M.R., Fernando R.M., Pereira L.S. (2003) Monitoring water and NO₃-N in irrigated maize fields in the Sorraia watershed. Portugal. *Agric. Water Management*, 60: 199–216.

Castillo M.M. (2010) Land use and topography as predictors of nutrient levels in a tropical catchment. *Limnologia*, 40: 322–329.

Ciampitti I.A., García F.O. (2008) Balance y eficiencia de uso de los nutrientes en sistemas agrícolas. *Revista Horizonte A.*, 18: 22-28.

Giaccio G.C.M. (2001) Ambientes ribereños de arroyos del sur y sudeste bonaerense: tipificación y comparación de algunas propiedades relevantes para el filtrado del escurrimiento superficial. Tesis para optar por el título de Magister. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Mar del Plata.

Collins R., Jenkins A. (1996) The impact of agricultural land use on stream chemistry in the Middle Hills of the Himalayas, *Nepal Journal of Hydrology*, 185: 71-86.

Di Fiori E., Pizarro H., dos Santos Afonso M., Cataldo D. (2012). Impact of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* on glyphosate concentration in water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81: 106–113.

Dodds W.K. (2006) Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnol. Oceanogr.*, 51: 671–680.

Drury C.F., Mc Kenney D.J., Findlay W.I., Gaynor J.D. (1993) Influence of tillage on nitrate loss in surface runoff and tile drainage. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 57: 797–802.

Fertilizar- Asociación Civil (2014)
<http://www.fertilizar.org.ar/2014/estadisticas.php>

García F.O. (2002) Manejo de la fertilidad de suelos y fertilización de cultivos para altos rendimientos en la región pampeana argentina. Resumen de la presentación realizada en la 4ª Conferencia Fertilizantes Cono Sur organizada por British Sulphur Pub., Porto Alegre, Brasil.

Han J.G., Li Z.B., Li P., Tian J.L. (2010) Nitrogen and phosphorous concentrations in runoff from a purple soil in an agricultural watershed. *Agricultural Water Management*, 97: 757–762.

Heredia O. (2010) Calidad de agua para riego, pp: 139-149. *Aspectos Ambientales de las Actividades Agropecuarias*. Ed. Agrovot, 2ed.

Hoodaa P.S., Moynagh M., Svoboda I.F., Thurlow M., Stewart M., Thomson M., Anderson H.A. (1997) Streamwater nitrate concentrations in six agricultural catchments in Scotland. *The Science of the Total Environment*, 201: 63-78.

Honisch M., Hellmeier C., Weiss K. (2002) Response of surface and subsurface water quality to land use changes. *Geoderma*, 105: 277–298.

Howarth R.W., Billen G., Swaney D., Townsend A., Jaworski N., Lajtha K., Downing J.D., Elmegren R., Caraco N., Jordan T., Berendse F., Freney J., Kudeyarov V., Murdoch P., Zhao Liang Z. (1996) Regional nitrogen budgets and riverine N and P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean: natural and human influences. *Biogeochemistry*, 35: 75–139.

Jones K.B., Neale A.C., Nash M.S., Van Remortel R.D., Wickham J.D. (2001) Predicting nutrient and sediment loadings to streams from landscape metrics: a multiple watershed study from the United States Mid-Atlantic Region. *Landsc. Ecol.*, 16: 301–312.

Jordan T.E., Correll D.L., Weller D.E. (1997) Relating nutrient discharges from watersheds to land use and streamflow variability. *Water Resources Research*, 33 (11): 2579- 2590.

Liu A., Ming J., Ankumah R.O. (2005) Nitrate contamination in private wells in rural Alabama, United States. *Science of the Total Environment*, 346: 112– 120.

Macdonald A.J., Poulton P.R., Powlson D.S., Jenkinson D.S. (1997) Effects of season, soil type and cropping on recovery of residues and losses of ¹⁵N-labelled fertilizer applied to arable crops in spring. *J. Agric. Sci.*, 129: 125–154.

Mallin M.A., Johnson V.L., Ensign S.H., Macpherson T.A. (2006) Factors contributing to hypoxia in rivers, lakes, and streams. *Limnol. Oceanogr.*, 51: 690–701.

Manassero A., Passalia C., Negro A.C., Cassano A.E., Zalazar C.S. (2010) Glyphosate degradation in water employing the H₂O₂/UVC process. *Water Research*, 44: 3875-3882.

Mariuzzi A.A., Romero M.C., Conzonno V.H. (1988) Ciclo anual y heterogeneidad espacial de procesos autotróficos y heterotróficos, y caracteres fisicoquímicos del embalse Río Tercero, Córdoba, Argentina. *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral*, 19 (2): 167-181.

Nash D.M., Halliwell D.J. (2000) Tracing phosphorous transferred from grazing land to water. *Wat. Res.*, 34 (7): 1975-1985.

Oomen G.J.M. (1995) Nitrogen cycling and nitrogen dynamics in ecological agriculture. *Nitrogen Leaching in Ecological Agriculture. Biol. Agric. Horticult.*, 11: 183-192.

Pekarova P., Pekár J. (1996) The impact of land use on stream water quality in Slovakia. *Journal of Hydrology*, 180: 333-350.

Peltzer P.M., Lajmanovich R.C., Attademo A.M., Junges C.M., Cabagna-Zenklusen M.C., Repetti M.R., Sigrist M.E., Beldoménico H. (2013) Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined tree frog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98: 142-151.

Peterson G.A., Power J.F. (1991) Soil, crop and water management. In: Follett, R.F., Keeney, D.R., Cruse, R.M. (Eds.), *Managing Nitrogen for Groundwater Quality and Farm Profitability*. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, pp. 189-221.

Portela S.I., Andriulo A.E., Jobbagy E.G., Sasal M.C. (2009) Water and nitrate exchange between cultivated ecosystems and groundwater in the Rolling Pampas. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 134: 277-286.

Quintero C.E., Boschetti N.G., Benavidez R.A. (1996) Estimación de la capacidad máxima de adsorción de fosfatos en suelos de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia del suelo*, 14: 79-82.

Quiros R., Rennella A.M., Boveri M.B., Rosso J.J., Sosnovsky A. (2002a) Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología Austral*, 12: 175-185.

Quiros R., Rosso J.J., Rennella A.M., Sosnovsky A., Boveri M.B. (2002b) Análisis del estado trófico de las lagunas pampeanas (Argentina). *Interciencia*, 27 (11): 584-591.

Quirós R., Boveri M.B., Petracchi C.A., Rennella A.M., Rosso J.J., Sosnovsky A., vonBernard H.T. (2006) The effects of the pampa wetlands agriculturization on shallow lakes eutrophication. *Eutrofização na América do Sul: Causas, conseqüências e tecnologias de gerenciamento e controle*, 1-16.

<http://www.agro.uba.ar/users/quiros/Eutrofizacion/Quirosetal2006EUTROSUL.pdf>

Raun W.R., Johnson G.V. (1995) Soil-plant buffering of inorganic nitrogen in continuous winter wheat. *Agron. J.*, 87: 827-834.

Reynolds Vargas J.S., Richter D.D. (1995) Nitrate in groundwaters of the Central Valley , Costa Rica. *Environment. International*, 21 (1): 71-79.

Rimski-Korsakov H., Rubio G., Lavado R. S. (2004) Potential nitrate losses under different agricultural practices in the pampas region, Argentina. *Agricultural Water Management*, 65: 83–94.

Rosso J.J., Fernandez Cirelli A. (2012) Effects of land use on environmental conditions and macrophytes in prairie lotic ecosystems. *Limnologica*, 43 (1): 18–26.

Sande P., Mirás J.M., Vidal E., Paz A. (2005) Formas de fósforo y su relación con la erosión en aguas superficiales bajo clima Atlántico. *Estudios de la Zona No Saturada del Suelo*, Vol VII. F.J. Samper Calvete y A. Paz González.

http://www.abe.ufl.edu/Faculty/carpena/files/pdf/zona_no_saturada/estudios_de_la_zona_v7/c125-130.pdf

Satorre E.H. (2005) Cambios tecnológicos en la agricultura actual. *Ciencia Hoy*, 15: 24–31.

Schilling K.E., Libra R.D. (2000) The Relationship of Nitrate Concentrations in Streams to Row Crop Land Use in Iowa. *Journal of Environmental Quality*, 29 (6): 1846-1851.

Torri S., Urricarriet S., Ferraris G.N., Lavado R.S. (2010) Micronutrientes en agrosistemas. Citado en: Alvarez R., Rubio G., Alvarez C.R., Lavado R.S. (Eds.). *Fertilidad de suelos. Caracterización y manejo en la región pampeana*. Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires: 3955-423.

Viglizzo E.F., Lértora F., Pordomingo A.J., Bernardos J.N., Roberto Z.E., Del Valle H. (2001) Ecological lessons and applications from one century of low external-input farming in the pampas of Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 83: 65–81.

Viglizzo E.F., Pordomingo A.J., Buschiazzi D., Castro M.G. (2005) A Methodological Approach to Assess Cross-scale Relations and Interactions in Agricultural Ecosystems of Argentina. *Ecosystems*, 8: 546–558.

Viglizzo E.F., Ricard M.F., Jobbágy E.G., Frank F.C., Carreño L.V. (2011) Assessing the cross-scale impact of 50 years of agricultural transformation in Argentina. *Field Crops Research*, 124: 186–194.

Vila Pinto I. (2003) Caracterización de ecosistemas acuáticos. Interacciones sedimento-agua. El agua en Iberoamérica. Aportes para la integración entre los organismos de gestión y los centros de investigación. RED CYTED XVII. Aprovechamiento y Gestión de Recursos Hídricos. Pág 17 -23.

Wu J.J., Bernardo D.J., Mapp H.P., Geleta S., Teague M.L., Watkins K.B., Sabbagh R.L., Elliott R.L., Stone J.F. (1997) An evaluation of nitrogen runoff and leaching potential in the high plains. *J. Soil Water Conserv.*, 52: 73–80.

Yin Y., Liang C.H. (2013) Transformation of phosphorus fractions in paddy soil amended with pig manure. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13 (4): 809-818.

-CAPÍTULO 5-

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORPIRIFOS EN MUESTRAS DE AGUA Y SEDIMENTO EN EL PARTIDO DE TRES ARROYOS

5.1. INTRODUCCIÓN

El clorpirifos es uno de los insecticidas más frecuentemente detectados en aguas superficiales de algunas regiones del mundo (Watts, 2012). Este compuesto es a menudo aplicado cuándo los cultivos comienzan a crecer para controlar insectos del suelo y gusanos cortadores (*Agrotis ipsilon*, *Agrotis malefida*, *Peridroma saucia*, *Euxoa sp.*). Luego durante la temporada de crecimiento, para combatir a las orugas desfoliadoras (Lepidoptera) y más tarde, en la etapa de fructificación, para controlar chinches (Hemiptera) y al barrenador *Epinotia aporema* (Lepidoptera, Tortricidae) (Mugni *et al.*, 2012).

Al ser aplicado en el suelo o cerca de él permanece en el área cercana porque se adhiere fuertemente a las partículas del mismo (ATSDR, 1997). La acción erosiva del suelo, tanto de origen pluvial como atribuible a la irrigación, es potencialmente responsable del transporte de clorpirifos aplicado en áreas agrícolas hacia las aguas superficiales. Cuando los cultivos alcanzan cierto tamaño, las aplicaciones aéreas son comunes para evitar el

riesgo de daño por vehículos terrestres y esto proporciona una vía alternativa para la contaminación de los cursos de agua cercanos (Mugni *et al.*, 2011).

Una vez que llega al cuerpo de agua superficial, se une a la materia orgánica del material particulado de la columna de agua y a los sedimentos del fondo, y puede sufrir la degradación a través de la hidrólisis que es una de las principales vías de transformación para el clorpirifos, dando como producto principal al 3,5,6-tricloropiridinol (TCP) (Hui *et al.*, 2010). En este sentido mientras que algunos estudios muestran que entre el 30% y el 60% del Dursban, uno de los nombres comerciales del clorpirifos, desaparece de la fase acuosa en 24 horas (Hughes *et al.*, 1980), otros afirman que el 90% es adsorbido en un tiempo comprendido entre 2 y 10 días (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005). Se ha informado que la biomasa de los microorganismos del suelo se redujo entre un 25% y un 50% luego del tratamiento con concentraciones de clorpirifos de 10 y 50 mg/kg (Vischetti *et al.*, 2007).

Para conocer el riesgo potencial de un pesticida es necesario conocer el K_{oc} (coeficiente de adsorción a la materia orgánica) y el tiempo de vida media, que expresa la persistencia de un compuesto en diferentes tipos de matrices (agua, suelo, sedimentos, etc.). El tener un alto K_{oc} aumenta las posibilidades de que los compuestos orgánicos se adhieran a las partículas del suelo y sean acarreados a los cuerpos de agua por escorrentía (Arias-Estévez *et al.*, 2008). En general, se considera que aquellos compuestos que posean un $K_{oc} \geq 1000$ ml/g (o l/ kg) permanecerán en la superficie del suelo o cerca de él, cuando posean una moderada cantidad de materia orgánica (Flury, 1996; Watson, 1996).

La alta afinidad del clorpirifos por la materia orgánica es atribuida a su baja solubilidad en agua y a sus altos coeficientes de K_{oc} (Tabla 1.2). La mayoría de los valores de K_{oc} reportados son para suelos, pero su afinidad es aún mayor en sedimentos acuáticos (Gebremariam *et al.*, 2012). Las interacciones de los plaguicidas con los suelos han sido objeto de mucho estudio usando las llamadas isotermas de adsorción y desorción. Los valores de K_{oc} , en suelos y sedimentos, obtenidos en algunos casos fueron de 3.606 a 5.983 ml/g (Gebremariam *et al.*, 2012). En otros trabajos se han publicado valores aún mayores de K_{oc} de 6.070 y 9.930 ml/g (Junod *et al.*, 2009).

El decaimiento del clorpirifos en aguas naturales y sedimentos puede producirse por procesos bióticos (degradación bacteriana) y abióticos (hidrólisis y fotólisis química) (Racke,

1993; Bondarenko *et al.*, 2004; Hui *et al.*, 2010). La hidrólisis del clorpirifos es uno de los principales procesos de su decaimiento en aguas y sedimentos y depende principalmente del pH y la temperatura. Bajo ciertas circunstancias la fotólisis puede ser de importancia (Palumbo *et al.*, 2012; Racke, 1993). La persistencia se ve incrementada por la disminución del pH y la temperatura en ambas matrices, y por el aumento de la materia orgánica (Hui *et al.*, 2010;), la concentración inicial aplicada, la falta de humedad y anaerobiosis en sedimentos y suelos (Hui *et al.*, 2010; Gebremariam *et al.*, 2011; Alvarez *et al.*, 2013).

Algunos autores sostienen que la presencia de sales y metales aumentan la hidrólisis del clorpirifos (Hui *et al.*, 2010) en aguas naturales, mientras que el material particulado, los minerales de arcilla, los ácidos húmicos y la materia orgánica disuelta lo disminuyen, debido a que se adsorbe a los mismos (Liu *et al.*, 2001; Hui *et al.*, 2010).

Ciertas fracciones de clorpirifos pueden persistir por días debido a que las tasas de hidrólisis decrecen desde 2,5 a 3 veces con un descenso de 10 grados de temperatura (Hui *et al.*, 2010). También se ha observado que la degradación de este insecticida depende de la intensidad de luz, siendo mayor a mayores intensidades y llegando a degradarse un 51,95% en lagos en un período de 12 días (Hossain *et al.*, 2013). Bondarenko *et al.* (2004) mostraron que las transformaciones bacterianas pueden ser responsables de entre un 50% y un 80% de la destrucción del clorpirifos en aguas naturales y que la persistencia del mismo aumenta en agua de mar. Hui *et al.* (2010) analizó la hidrólisis del clorpirifos en diferentes medios acuosos y encontró vidas medias que variaron de 4,57 a 14 días.

Gebremariam *et al.* (2011, 2012) realizaron estudios de adsorción y desorción del clorpirifos en varios tipos de sedimentos con diferente contenido de carbono orgánico. Estimaron el porcentaje desorbido en cuatro pasos sucesivos y en todos ellos observaron liberación de este insecticida desde los sedimentos. Estos autores propusieron que en este tipo de matrices sólidas existen dos fracciones, una lábil y otra no lábil. La primera sufriría biodegradación y sería de sólo 18-28% de la masa total del contaminante. Su porcentaje aumentaría con la cantidad de carbono de los sedimentos. La fracción no lábil sería la que actuaría como una fuente secundaria de contaminación.

En nuestro país existen trabajos que se refieren a la determinación de contaminación de clorpirifos en arroyos de la provincia de Buenos Aires (Jergentz *et al.* 2004; Jergentz *et al.* 2005; Marino y Ronco, 2005; Peruzzo *et al.*, 2008; Ronco *et al.*, 2008; Di Marzio *et al.*, 2010;

Mugni *et al.*, 2011; Mugni *et al.*, 2012). Sin embargo, no existen antecedentes en nuestra área de estudio.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron cuatro campañas de muestreo en el Partido de Tres Arroyos, provincia de Buenos Aires. En las mismas se colectaron muestras de agua (n=20) y sedimento (n=20) por duplicado. Las campañas se realizaron durante junio/diciembre de 2009 y mayo/diciembre de 2010, en los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos y en el inicio y la desembocadura del arroyo Claromecó (Figuras II.9 y II.11). El total de muestras obtenidas a campo para el agua y el sedimento fue de 40 para cada matriz a lo largo de todo el estudio realizado. Como se mencionó anteriormente, los cultivos que predominan a partir de abril son el trigo, la cebada y el girasol y desde septiembre la soja y el maíz. Se compararon los resultados entre cultivos de invierno y de primavera/verano como cultivos estivales, debido a que son las fechas en las cuales se aplica este compuesto dada la información suministrada por asesores de la zona.

5.2.1. Toma de muestras a campo en las distintas matrices

5.2.1.1. Muestras de agua

Las muestras de agua se colectaron por duplicado, en envases de vidrio opacos de 1 litro. Se evitó la entrada de aire, y se colocó un trozo de papel metalizado para evitar el contacto de la muestra con la tapa de plástico.

5.2.1.2. Muestras de sedimento

En cada uno de los arroyos se colectaron dos muestras superficiales de sedimentos a una profundidad de hasta 20 cm, utilizando una pala plana, y se mantuvieron en heladera a una temperatura de 4 °C hasta el momento de su extracción en el laboratorio.

5.2.2. Extracción de clorpirifos en las distintas matrices

5.2.2.1. Muestras de agua

Las muestras de agua sin filtrar, se analizaron por duplicado, adicionando 250 ml de agua en ampollas de vidrio de 500 ml. Se extrajeron tres veces con 50 ml de una mezcla de acetona: hexano (50:50), se secaron con sulfato de sodio anhidro y se filtraron, para finalmente concentrarse hasta un volumen de 1 ml. Luego los extractos fueron analizados en un cromatógrafo gaseoso con detector de captura electrónica, siguiendo el método descrito en 2.2.5.

5.2.2.2. Muestras de sedimento

Se siguió el método especificado en 2.2.4.

5.2.3. Cuantificación de clorpirifos

Se siguió el método especificado en 2.2.5. Por otra parte, se usó una columna capilar Quadrex (Fase: 007-1 (methyl silicone); largo: 30 mts; DI: 0,53 mm; film: 0,5u como columna de confirmación.

5.2.4. Transferencia de clorpirifos desde los sedimentos al agua

Tomando como referencia el trabajo de Gebremariam *et al.* (2011) se calcularon para todos los arroyos las concentraciones de clorpirifos que podrían ser liberadas desde los sedimentos hacia el agua. Para poder realizar dicho cálculo, elegimos de entre los suelos informados por ellos, aquellos que poseían un contenido de materia orgánica similar a los nuestros. Para cada valor de concentración de clorpirifos ($\mu\text{g/l}$) en los sedimentos, se estima la fracción no lábil y luego se divide cada valor por el respectivo K_{oc} (l/kg). De esta manera se obtienen los $\mu\text{g/l}$ de concentración de clorpirifos liberados al agua.

5.2.5. Análisis estadístico

Mediante estadística descriptiva se analizaron los resultados de clorpirifos en agua y sedimento agrupando los datos por fecha de muestreo sin discriminar sitio, al igual que se realizó el análisis en los diferentes cursos de agua sin considerar las fechas de obtención de las muestras. Este análisis nos permitió comprender la distribución de los datos obtenidos.

También se utilizaron los test de ANOVA Factorial con contrastes de Tuckey HSD para analizar las concentraciones de clorpirifos halladas en los diferentes sitios para las diferentes fechas, y comprobar si existía alguna interacción entre los valores. Luego el test a posteriori de Tuckey HSD nos permitió encontrar diferencias significativas entre fechas y sitios de muestreo.

Como se mencionó anteriormente, el total de muestras fue de 20 para cada matriz (agua y sedimento) considerando el promedio de los duplicados obtenidos a campo.

El análisis de regresión-correlación ($p < 0,05$) nos permitió comparar las historias de contaminación de los arroyos que podrían comportarse de manera similar, en las mismas fechas de muestreo, debido a procesos de escurrimiento superficial y deriva por vientos.

En todos los casos se probaron los supuestos de Normalidad y Homocedasticidad. Cuando no se cumplió con la homogeneidad de varianza se transformaron los datos con el logaritmo en base 10 (Sokal y Rohlf, 1995).

Los datos son presentados como medias con sus respectivos valores de desviación estándar. Los programas estadísticos utilizados fueron: Statistica 10.0 (Statsoft, Inc.) y BioEstat 3.0. (Ayres *et al.*, 2007).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Agua

5.3.1.1. Concentración de clorpirifos

Se detectó clorpirifos en todas las muestras de agua analizadas, siendo el rango de concentraciones de 0,01 a 2,78 $\mu\text{g/l}$. La estadística descriptiva se observa en las tablas 5.1 y 5.2.

En la Tabla 5.1 se observa que tanto en las campañas de invierno como de verano de 2009 (en negrita) los valores de concentración de clorpirifos en agua ($\mu\text{g/l}$), máximos, medias y tercer cuartil, son mayores en comparación con las del 2010. Sin embargo, la mediana deja en evidencia que los valores centrales de concentración, y por ende las aplicaciones de este pesticida, son mayores durante el período invernal tanto para junio de 2009 como para mayo de 2010.

Tabla 5.1. Valores de concentración del insecticida clorpirifos registrados en el agua ($\mu\text{g/l}$) de los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos e inicio y desembocadura del arroyo Claromecó, durante las cuatro campañas realizadas (N=40). Las concentraciones se agruparon por la fecha de obtención de las muestras sin identificar la estación de muestreo. En negrita se destacan los valores máximos, medias y del tercer cuartil de las cuatro campañas realizadas.

	jun-09	dic-09	may-10	dic-10
Valor mínimo	0,07	0,07	0,03	0,01
Valor máximo	2,78	1,96	0,79	0,29
Mediana	0,21	0,15	0,29	0,10
Primer Cuartil (25%)	0,10	0,10	0,09	0,02
Tercer Cuartil (75%)	0,56	0,59	0,41	0,23
Média Aritmética	0,75	0,58	0,32	0,13

Cuando se analizan los resultados de concentración de clorpirifos en agua para cada uno de los sitios de muestreo (Tabla 5.2), se observa que los mayores valores y las concentraciones del tercer cuartil, se registraron en el arroyo 2 (2,78 $\mu\text{g/l}$) de Tres Arroyos y en la desembocadura del A° Claromecó (1,96 $\mu\text{g/l}$). En este caso, la mediana exhibe los

mayores valores de concentración en el A° Claromecó, tanto en el inicio como en su desembocadura, indicando que en general las concentraciones que llegan a este arroyo son mayores que las registradas para los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos.

Tabla 5.2. Valores de concentración del insecticida clorpirifos registrados en el agua ($\mu\text{g/l}$) de los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos e inicio y desembocadura del arroyo Claromecó, durante las cuatro campañas realizadas (N=40). Las concentraciones se agruparon por sitio de muestreo sin discriminar la fecha de obtención de las muestras. En negrita se destacan los valores máximos, medianas y del tercer cuartil de las cinco estaciones de muestreo analizadas.

	A1	A2	A3	I	D
Mínimo	0,01	0,02	0,10	0,07	0,21
Máximo	0,56	2,78	0,79	0,59	1,96
Mediana	0,05	0,12	0,10	0,29	0,32
Primer Cuartil (25%)	0,03	0,07	0,10	0,23	0,22
Tercer Cuartil (75%)	0,20	0,81	0,27	0,37	0,79
Média Aritmética	0,17	0,76	0,27	0,31	0,70

El ANOVA Factorial mostró diferencias significativas cuando se compararon las medias de concentración obtenidas para cada sitio de muestreo, por fecha ($p < 0,000001$) y por lugar ($p < 0,000001$). Como la interacción entre ambas dio significativa, se procedió a analizar cada sitio por separado, considerando solo la fecha en las cuales habían sido tomadas las muestras.

A continuación se presentan los resultados de los diferentes Anova, con sus respectivos contrastes *a posteriori* de Tuckey, realizados para cada uno de los sitios (A1, A2, A3, I y D) individualmente. En todos los arroyos se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la concentración de clorpirifos determinada para las distintas fechas, con excepción del A° 3 (Tabla 5.3). En este último caso, no se observaron diferencias entre las campañas realizadas.

Los arroyos 1 y 2 presentaron diferencias significativas entre las medias de las concentraciones en las cuatro fechas de muestreo (Arroyo 1: $p = 0,013$; Arroyo 2: $p = 0,000002$). Las mayores concentraciones se registraron durante junio de 2009, en ambos casos, con

valores significativamente mayores respecto de las medias obtenidas para el resto de las campañas. Estos fueron de 0,56 µg/l ($p<0,03$) para el Arroyo 1 y 2,78 µg/l ($p<0,0003$) para el Arroyo 2.

El arroyo 3 no mostró diferencias significativas ($p=0,117$) entre las campañas de invierno y verano. El valor medio de clorpirifos fue de 0,272 µg/l. El error estándar fue considerable en la muestra correspondiente a mayo de 2010.

El arroyo Claromecó presentó diferencias significativas entre las medias de concentración halladas, tanto en el inicio ($p=0,015$) como en la desembocadura ($p=0,003$). Durante diciembre de 2009 se detectaron las mayores concentraciones de clorpirifos en agua, con valores de 0,59 y 1,96 µg/l para el inicio y la desembocadura respectivamente. En el caso del inicio, el valor de 0,59 µg/l fue significativamente mayor al valor registrado de concentración durante junio de 2009 ($p=0,012$). Sin embargo, no presentó diferencias con el resto de las concentraciones medias analizadas de mayo y diciembre de 2010. En la desembocadura el valor antes mencionado de 1,96 µg/l fue significativamente mayor ($p<0,007$) a los del resto de las campañas realizadas. Las concentraciones de junio de 2009 y mayo-diciembre de 2010 no presentaron diferencias entre ellas, probablemente debido al alto error estándar registrado en mayo-diciembre de 2010.

Tabla 5.3. Concentración media de clorpirifos \pm SD (µg/l) en el agua de los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos e inicio y desembocadura del arroyo Claromecó, durante las cuatro campañas realizadas (N=40). Los asteriscos indican, para las máximas concentraciones de clorpirifos, aquellas que presentaron diferencias significativas con el resto de las fechas analizadas, en cada una de las estaciones de muestreo (* $p<0,05$; ** $p<0,01$). Los resultados corresponden al Anova con contrastes *a posteriori* de Tuckey.

Agua	jun-09	dic-09	may-10	dic-10
A° 1	0,56 \pm 0,20*	0,08 \pm 0	0,03 \pm 0	0,01 \pm 0
A° 2	2,78 \pm 0,10**	0,15 \pm 0,03	0,09 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01
A° 3	0,10 \pm 0,02	0,10 \pm 0,03	0,79 \pm 0,49	0,10 \pm 0,10
I	0,07 \pm 0,06	0,59 \pm 0,06*	0,30 \pm 0,10	0,29 \pm 0,11
D	0,21 \pm 0,01	1,96 \pm 0**	0,41 \pm 0,41	0,23 \pm 0,07

Por otra parte, se verificó la existencia de correlación positiva entre las concentraciones de clorpirifos en el agua para los arroyos 1 y 2 de Tres Arroyos (Figura 5.1). Esto sugiere que la entrada de agroquímicos se produce de manera similar en ambos cuerpos de agua, debido a su posición geográfica y al tipo de plantaciones de los campos adyacentes.

No se observó ninguna relación entre el agua del inicio y desembocadura del arroyo Claromecó como así tampoco entre los sedimentos de los distintos arroyos (no mostrado).

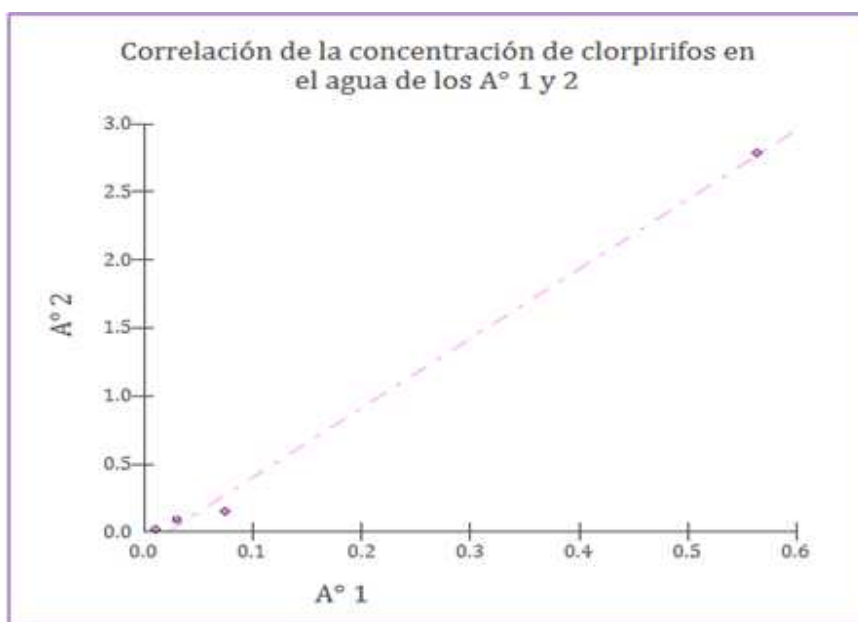


Figura 5.1. Correlación lineal de Pearson para la concentración hallada de clorpirifos en el agua ($\mu\text{g/l}$) en los arroyos 1 y 2 de Tres Arroyos (r (Pearson) = 0,9981; R^2 = 0,996; p = 0,00001).

5.3.1.2. Parámetros físico-químicos y su relación con la concentración de clorpirifos

En relación a la concentración de clorpirifos en el agua de los arroyos 1 y 2, los valores registrados en junio fueron los más altos de todas las campañas realizadas. En este mes se obtuvieron valores de pH de 9,15 y 9,19 con temperaturas de 3,5 y 4,9 °C y una concentración de sólidos totales disueltos de 739 y 872 ppm. La cantidad de sólidos totales disueltos (partículas de menos de 1 μm cargadas) y sólidos en suspensión, con valores registrados de

0,92 y 1,39 g/l, no se relacionan con la alta concentración de clorpirifos hallada, pero son coincidentes con las bajas precipitaciones registradas. Si bien los arroyos 1 y 2 mostraron comportamientos similares, la variabilidad observada en relación a la concentración de clorpirifos fue alta, y esta diferencia podría estar relacionada con la temperatura, el pH o la concentración de sales presentes en las aguas. Mínimos cambios de estos factores modifican ampliamente la persistencia de este insecticida (Hui *et al.*, 2010).

El arroyo 3 no mostró una correlación en la concentración de clorpirifos, con los arroyos 1 y 2 (no mostrado). Si observamos las características físico-químicas del arroyo 3 (Tabla 5.4) durante junio de 2009, vemos que presentó una concentración de sólidos totales disueltos y de sólidos totales de 1.086 ppm y de 1,88 g/l, valores mucho mayores a los registrados en los arroyos 1 y 2. A pesar de esto el arroyo 3 no mostró diferencias entre las concentraciones de clorpirifos y el promedio fue de 0,27 µg/l. Mugni *et al.*, (2011) hallaron que no siempre la cantidad de sólidos en suspensión provenientes del agua de escorrentía se relaciona con la presencia de clorpirifos, debido a que la actividad microbiana actúa luego de la aplicación, y depende del tiempo transcurrido entre ésta y las últimas precipitaciones. Existen diversos factores que pueden influir en el transporte de clorpirifos desde los campos cultivados hasta los cuerpos de agua superficiales y uno de ellos es el viento, que puede ocasionar por deriva la entrada de este pesticida. Los vientos predominantes son del sector norte y noroeste (Cortizo y Isla, 2007; Bertola *et al.*, 2009). Por otro lado, la pendiente también puede influir en la entrada de clorpirifos por escorrentía. Un estudio realizado en la zona por Giaccio (2011) indicaría que la pendiente es variable y es menor en ciertas zonas del arroyo 3 (pendiente de 15%) dónde solo se observan gramíneas y dicotiledóneas, a diferencia de los arroyos 1 y 2 (pendiente es cercana a 29%) en dónde hay además arbustos y árboles. La menor pendiente podría ocasionar un menor efecto de escorrentía y la vegetación ribereña actuar como una barrera. Sin embargo, para poder confirmar que factor es el que más influye en esta zona debería de realizarse un modelado matemático que considere todos los factores que están actuando.

Si analizamos las concentraciones de clorpirifos en las aguas del inicio y la desembocadura del arroyo Claromecó durante diciembre de 2009, vemos que en la desembocadura los valores de clorpirifos son mucho mayores a los del inicio. Esto podría deberse a que el arroyo Claromecó posee en sus márgenes campos cultivados a lo largo de

todo su recorrido, mientras que en el inicio las fluctuaciones de este insecticida podrían estar más relacionadas con eventos de escorrentía producidos aguas arriba (Mugni *et al.*, 2011).

Por otra parte, unos quince días antes del período de la toma de muestras hubo una precipitación de 44 mm, lo que probablemente produjo un evento de escorrentía. Esto sería coincidente con los valores obtenidos de sólidos totales de 14,46 g/L en la desembocadura e indicaría la entrada de material particulado desde los campos circundantes conjuntamente con este insecticida (Tabla 5.5).

Las precipitaciones registradas en el partido de Tres Arroyos para las cuatro campañas realizadas se observan en las Figuras 4.1 y 4.2. Estas por sí mismas no pueden explicar la amplia variabilidad observada entre los diferentes arroyos analizados. Otros factores deben tenerse en cuenta al estudiar la distribución del clorpirifos como las fechas de aplicación, las frecuencias, la concentración aplicada (Watts, 2012), la forma en la que se aplicó el pesticida sobre el cultivo (terrestre o aéreo) y la distancia de los campos a los arroyos. Debido a que no siempre se toma en cuenta la dirección de los vientos, la dispersión puede ser muy alta cuándo se lo aplica por aire. Jergentz *et al.* (2004) hallaron altas concentraciones de clorpirifos en agua y sedimentos sin que se hubieran registrado precipitaciones. Ellos atribuían la contaminación observada a las aplicaciones realizadas con avionetas sobre los campos. Tanto nuestros resultados como los publicados por estos autores, indicarían que no siempre existe una relación directa entre la cantidad de precipitaciones (mm) y la concentración de clorpirifos hallada en el agua de los arroyos (Jergentz *et al.*, 2004; Jergentz *et al.*, 2005; Mugni *et al.*, 2011).

Por otra parte, otras causas que podrían determinar los eventos de escorrentía son la frecuencia de las precipitaciones y su intensidad, además del tiempo que transcurre entre la aplicación y las lluvias. Se ha observado que, en algunos casos, la contaminación por clorpirifos es determinada por las aplicaciones aguas arriba de los lugares dónde se tomaron las muestras (Mugni *et al.*, 2011) mostrando la dificultad de predecir este tipo de efectos a campo.

Las lluvias por sí mismas no explican la presencia de clorpirifos en todas las muestras analizadas, por ende es factible que otro proceso como la hidrólisis esté actuando en las variaciones observadas. Este proceso es clave en la degradación de este insecticida y otros fosforados y se ve incrementado por el aumento de la temperatura, la luz y el pH (Gilani *et al.*,

2010; Watts, 2012). Existen estudios que demuestran que a altos niveles de pH la degradación del clorpirifos, al igual que la que se produce con otros organofosforados, es mayor a la observada a pH ácido (Anwar *et al.*, 2009; Hui *et al.*, 2010). Algunos autores consideran además que la enzima responsable de la biodegradación tendría su actividad enzimática óptima a elevados pH (Anwar *et al.*, 2009).

Nuestros valores de pH mostraron rangos de 8,1 a 9,19 durante las campañas de invierno y de 7,9 a 9,32 en las de verano; y las temperaturas variaron de 3,5 a 14,8 °C en las campañas de invierno y de 20,1 a 23,5°C en las de verano (Tablas 5.4 y 5.5). Se ha estimado la persistencia de clorpirifos en el agua de hasta 25 días a un pH de 8,1 (Watts, 2012) y de 16 días a un pH de 9,1 (WHO, 2009) a una temperatura de 25°C. De acuerdo con nuestras medidas de pH y temperatura, es factible que tanto en invierno como en verano la persistencia del clorpirifos sea aún mayor, debido a que las temperaturas registradas en nuestros arroyos fueron menores a 25 °C, y las tasas de hidrólisis decrecen desde 2,5 hasta 5 veces con un descenso de 10 grados de temperatura (Hui *et al.*, 2010).

Tabla 5.4. Promedio \pm SD (n=2) de los parámetros físico químicos en los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos correspondientes a los cultivos de otoño-invierno y primavera-verano. Las mediciones realizadas *in situ* poseen los siguientes errores de medición: T°C \pm 0,5; pH \pm 0,02; C.E./Sólidos disueltos: \pm 2% f.s. Ref: C.E.: conductividad eléctrica.

Sitio de muestreo	Día y horario	T°C	pH	Conductividad (μ S/cm)	Sólidos disueltos (ppm)	Sólidos totales (g/l)
A°1	27/06/09 (11:30)	3,5	9,15	1359	739	0,92
	1/12/09 (12:15)	22,7	8,54	1315	687	1,13
	08/05/10 (12:00)	11	8,8	1333	696	1,86
	05/12/10 (12:50)	22	8,35	1297	673	1,14
A°2	27/06/09 (13:00)	4,9	9,19	1700	872	1,39
	1/12/09 (13:15)	21,8	9,32	1722	903	1,15
	08/05/10 (12:38)	13,8	8,97	1618	842	2,6
	05/12/10 (13:30)	23,1	8,89	1550	812	0,7
A°3	27/06/09 (14:48)	8,2	8,38	2090	1086	1,88
	1/12/09 (15:10)	22	8,18	2086	1083	7,64
	08/05/10(13:20)	12,5	8,1	1713	878	2,3
	05/12/10 (14:20)	22	7,9	1307	680	0,46

Tabla 5.5. Promedio \pm SD (n=2) de los parámetros físico químicos en aguas del arroyo Claromecó correspondientes a los cultivos de otoño-invierno y primavera-verano. Las mediciones realizadas *in situ* poseen los siguientes errores de medición: T°C \pm 0,5; pH \pm 0,02; C.E./Sólidos disueltos: \pm 2% f.s. Ref: C.E.: conductividad eléctrica; I: inicio; D: desembocadura.

Sitio de muestreo	Día y horario	T°C	pH	Conductividad (μ S/cm)	Sólidos disueltos (ppm)	Sólidos totales (g/l)
I	25/06/09 (15:30)	6,4	8,95	2115	1108	1,75
	02/12/09 (16:45)	20,1	8,95	2275	1184	1,44
	09/05/10 (11:35)	10,7	8,43	2012	1048	2,36
	7/12/10 (15:00)	22,1	8,4	1846	958	0,64
D	25/06/09 (12:30)	8,3	8,64	>3999	>2000	5,46
	04/12/09 (11:00)	21,6	8,17	>3999	>2000	14,46
	09/05/10 (14:06)	14,8	8,1	>3999	>2000	9,64
	07/12/10 (17:15)	22,8	8,2	>3999	>2000	5,7

5.3.2. Sedimento

5.3.2.1. Concentración de clorpirifos

Se detectó Clorpirifos en todas las muestras de sedimentos analizadas. Estas presentaron rangos de concentraciones que van desde el valor de 3,95 a 204,98 μ g/kg. En la Tabla 5.6 y 5.7 se presenta la estadística descriptiva de la concentración de este insecticida hallada en los sedimentos de los diferentes cursos de agua.

La estadística descriptiva evidenció que las mayores concentraciones de clorpirifos en los sedimentos (μ g/Kg) se registraron en el A₃ y en el A° Claromecó, inicio y desembocadura (en negrita) (Tabla 5.6). Por otro parte, el A₃ evidenció los mayores valores medios y las concentraciones más altas en el primer y tercer cuartil, probablemente debidas a una contaminación más antigua en ese arroyo.

Tabla 5.6. Valores de concentración del insecticida clorpirifos registrados en el sedimento ($\mu\text{g/Kg}$) de los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos e inicio y desembocadura del arroyo Claromecó, durante las cuatro campañas realizadas ($N=40$). Las concentraciones se agruparon por estación de muestreo sin discriminar la fecha de obtención de las muestras. En negrita se destacan los valores máximos, media, mediana, primer y tercer cuartil de las cinco estaciones de muestreo analizadas.

	A1	A2	A3	I	D
Valor mínimo	12,12	12,49	10,07	8,05	3,95
Valor máximo	48,91	69,36	168,91	106,43	204,98
Mediana	29,22	46,05	73,74	48,06	32,47
Primer Cuartil (25%)	23,48	22,98	54,71	23,06	23,28
Tercer Cuartil (75%)	35,60	66,57	100,64	77,66	77,65
Média Aritmética	29,87	43,49	81,61	52,65	68,47

En la tabla 5.7 se observa que los valores registrados de clorpirifos en los sedimentos ($\mu\text{g/kg}$) son mayores en los meses de verano del 2009 y 2010, en comparación con las campañas de invierno. Esto se evidencia en los valores máximos, media y mediana.

Tabla 5.7. Valores de concentración del insecticida clorpirifos registrados en el sedimento ($\mu\text{g/Kg}$) de los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos e inicio y desembocadura del arroyo Claromecó, durante las cuatro campañas realizadas ($N=40$). Las concentraciones se agruparon por fecha de obtención de las muestras sin identificar los sitios de muestreo. En negrita se destacan los valores máximos, media, mediana, primer y tercer cuartil de las cinco estaciones de muestreo analizadas.

	jun-09	dic-09	may-10	dic-10
Valor mínimo	3,95	28,06	8,05	31,16
Valor máximo	77,89	168,91	29,73	204,98
Mediana	12,49	48,91	26,47	69,59
Primer Cuartil (25%)	12,12	35,21	10,07	69,36
Tercer Cuartil (75%)	68,07	65,64	27,27	106,43

Média Aritmética	34,90	69,34	20,32	96,31
------------------	-------	-------	-------	-------

Para el análisis de la concentración de clorpirifos en los sedimentos, se volvió a utilizar un ANOVA Factorial con test *a posteriori* de Tuckey HSD. Nuevamente la interacción entre fecha y lugar dio significativa, al igual que las diferencias entre las medias por lugar ($p < 0,000006$) y por fecha ($p < 0,000001$), al comparar los distintos sitios de muestreo. Por lo tanto, se procedió a analizar cada sitio por separado, considerando solo la fecha en las cuales habían sido tomadas las muestras (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Concentración media de clorpirifos \pm SD ($\mu\text{g/Kg}$) en el sedimento de los arroyos 1,2 y 3 de Tres Arroyos e inicio y desembocadura del arroyo Claromecó, durante las cuatro campañas realizadas (N=40). Los asteriscos indican, para las máximas concentraciones de clorpirifos, aquellas que presentaron diferencias significativas con el resto de las fechas analizadas, en cada una de las estaciones de muestreo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Los resultados corresponden al Anova con contrastes *a posteriori* de Tuckey.

	jun-09	dic-09	may-10	dic-10
A° 1	12,12 \pm 0,01	48,91 \pm 4,15*	27,27 \pm 2,78	31,16 \pm 3,26
A° 2	12,49 \pm 0	65,64 \pm 4,27*	26,47 \pm 1,65	69,36 \pm 16,87*
A° 3	77,89 \pm 26,57	168,91 \pm 5,52*	10,07 \pm 5,10	69,59 \pm 2,41
I	68,07 \pm 5,47**	28,06 \pm 3,38	8,05 \pm 0,42	106,43 \pm 4,37**
D	3,95 \pm 1,48	35,21 \pm 8,44	29,73 \pm 11,77	204,98 \pm 53,12*

El arroyo 1 mostró diferencias en relación a los valores medios obtenidos ($p = 0,001722$). El valor más alto de clorpirifos registrado en los sedimentos fue de 48,91 $\mu\text{g/kg}$ durante diciembre de 2009, siendo significativamente mayor al resto de los valores de concentración ($p < 0,04$). Por otra parte, también se evidenció un valor significativamente menor al resto en junio de 2009 ($p < 0,04$).

El arroyo 2 mostró diferencias significativas ($p = 0,006521$) en las concentraciones de clorpirifos, siendo las mayores de 65,64 $\mu\text{g/kg}$ en diciembre de 2009 y de 69,36 $\mu\text{g/kg}$ en

diciembre de 2010. Ambas medias fueron significativamente más grandes ($p < 0,04$) que las registradas en junio de 2009 y mayo de 2010.

Por último, en el arroyo 3, también se observaron diferencias significativas entre las distintas fechas de muestreo ($p = 0,001554$). Por un lado, se registró la mayor concentración de clorpirifos durante diciembre de 2009 ($168,90 \mu\text{g/kg}$), y por el otro, la menor durante mayo de 2010 ($10,07 \mu\text{g/kg}$). Estos valores resultaron ser significativamente distintos ($p < 0,05$) a los obtenidos para el resto de las campañas (Tabla 5.8).

En el inicio del arroyo Claromecó se observaron diferencias significativas entre todos los valores analizados ($p = 0,000052$). Las concentraciones de clorpirifos halladas en los sedimentos del inicio siguieron el siguiente orden decreciente: dic10 ($106,43 \mu\text{g/kg}$) > jun09 ($68,07 \mu\text{g/kg}$) > dic09 ($28,06 \mu\text{g/kg}$) > may10 ($8,05 \mu\text{g/kg}$). En todos los casos las diferencias entre ellos mostraron ser significativas ($p < 0,003$).

En la desembocadura también se observó variación entre las concentraciones de clorpirifos halladas en las muestras ($p = 0,005839$), siendo de $204,98 \mu\text{g/kg}$ el mayor registro detectado en diciembre de 2010. Este valor fue significativamente más grande que el de junio-diciembre de 2009 y mayo de 2010 ($p < 0,02$). En el resto de las muestras no se observaron diferencias significativas probablemente a consecuencia del gran error estándar de diciembre de 2009 y mayo de 2010.

Por otra parte, se correlacionaron las concentraciones halladas de clorpirifos en ambas matrices (agua y sedimento) para cada uno de los arroyos, aplicando la correlación lineal de Pearson. En ninguno de los casos se observó diferencias significativas (resultados no mostrados).

5.3.2.2. Parámetros físico-químicos y su relación con la concentración de clorpirifos

Como se mencionó anteriormente, las mayores concentraciones de clorpirifos se observaron en junio de 2009, y en diciembre de 2009 y 2010.

Los sedimentos, a diferencia del agua, acumulan pesticidas por mucho más tiempo (Mugni *et al.*, 2011) dependiendo de las características propias de los mismos. Los pertenecientes al arroyo Claromecó mostraron valores de pH de 9,04 en el inicio y 9,14 en la desembocadura. En los arroyos 1, 2 y 3 de Tres Arroyos los valores de pH fueron de 8,92, 8,53

y 8,06, en ese orden. En relación al % de materia orgánica se registró el siguiente orden decreciente: A° 2 > A° 3 > I > A° 1 = D, con valores de 1,26, 0,96, 0,86 y 0,64 (Tabla 4.1). Todos los sedimentos son franco arenosos a excepción del arroyo 2 que es franco.

En relación a las concentraciones halladas de clorpirifos ($\mu\text{g/kg}$) en los sedimentos de los arroyos 1 y 2, podría considerarse que los sedimentos del A° 1 poseen una menor cantidad de materia orgánica y un pH mayor, mientras que los sedimentos del A° 2 poseen un mayor contenido de materia orgánica y un pH menor. El aumento del pH y la disminución de la materia orgánica son dos características que aumentan el decaimiento del clorpirifos por hidrólisis enzimática (Hui *et al.*, 2010; Gebremariam *et al.*, 2011), que es uno de los principales procesos de degradación de este insecticida y que puede ser tanto químico como bioquímico. La diferencia entre el contenido de materia orgánica fue más importante que la del pH, por ello es factible que presentaran mayores concentraciones de este compuesto los sedimentos del A° 2 en relación a los del A° 1. Este comportamiento fue observado por Boivin *et al.* (2005) cuando comparó trece suelos con diferentes características. Los cinco pesticidas analizados por este autor, presentaron un Kf (valor que expresa la capacidad de sorción de un pesticida para una dada concentración) mayor, cuando los suelos poseían un mayor contenido de materia orgánica y un menor pH.

En los casos del inicio y la desembocadura del arroyo Claromecó, éstos mostraron concentraciones muy dispares. Esto podría deberse a que por un lado, el inicio recibe la influencia de la contaminación que viene desde Tres Arroyos, y por el otro, el comportamiento observado en la desembocadura estaría más determinado por la influencia de los campos aledaños a lo largo de todo su recorrido en la localidad de Claromecó.

La vida media del clorpirifos en los suelos es variable (Watts, 2012). Se han informado valores que van desde 1 hasta 120 días, pero que pueden alcanzar el año (Fang *et al.*, 2008; Anwar *et al.*, 2009; Gilani *et al.*, 2010). Los factores que se mencionan como de importancia en la degradación de clorpirifos son: el tipo de suelo, el clima, el pH, la temperatura, la humedad, la cantidad de carbono orgánico, la formulación del pesticida, el estado nutricional de los suelos y el tipo de microorganismos (Lakshmi *et al.*, 2008; Anwar *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2009; Gilani *et al.*, 2010).

Nuestros propios resultados de experiencias realizadas con una formulación comercial de clorpirifos (48%) indican que la concentración aplicada también tendría importancia en la

persistencia del clorpirifos, siendo mayor a una menor concentración. Se registraron vidas medias de 15 y 6 días para concentraciones de 3 y 6 ppm. El suelo analizado pertenecía a la localidad de Navarro provincia de Buenos Aires, con un porcentaje de carbono orgánico de 1,82 y un pH de 7,05. El porcentaje de recuperación obtenido del clorpirifos para este suelo mostró un aumento progresivo hasta superar concentraciones de 24 ppm (Alvarez *et al.*, 2013).

5.3.3. Concentración de clorpirifos y su relación con las actividades agropecuarias de la zona

Como se dijo anteriormente, el clorpirifos es un compuesto organofosforado muy utilizado en la zona de estudio para combatir distintos tipos de insectos en los cultivos de soja, trigo, cebada, girasol y maíz. De estos cultivos, los que más se producen desde la campaña del 2009/2010 son: el trigo, la soja y la cebada cervecera, en ese orden. El trigo y la cebada son cultivos de invierno y la soja de 1° y 2° de verano. A modo de ejemplo, en la última campaña del 2011/2012, en la localidad de Tres Arroyos, se produjeron 635.450 toneladas de trigo, 323.250 toneladas de soja y 293.366 toneladas de cebada cervecera (SIIA, 2013).

En la Figura 5.2 se observan los valores de concentración de clorpirifos hallados en el agua de todos los arroyos analizados, y su relación con las aplicaciones de este insecticida en la zona de estudio. Los picos de junio de 2009, se corresponderían con las fumigaciones realizadas sobre los cereales de invierno, trigo y cebada, mientras que los de diciembre de 2009, con las aplicaciones sobre el cultivo de soja.

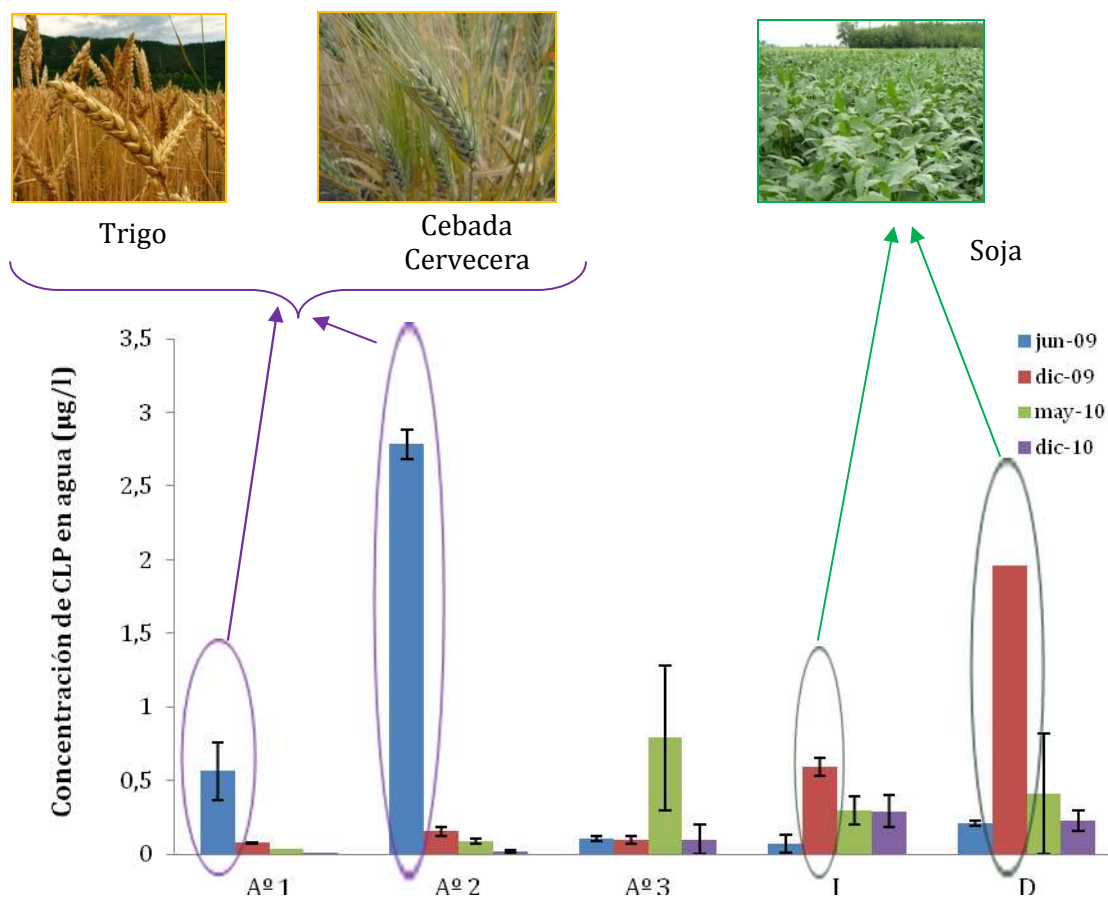


Figura 5.2. Concentraciones máximas de clorpirifos en agua ($\mu\text{g/l}$) \pm SD y su relación con los cultivos de invierno y verano en las diferentes estaciones de muestreo del Partido de Tres Arroyos (Referencia: CLP: clorpirifos).

De manera similar podemos observar estacionalmente la variación de clorpirifos obtenido en las muestras de sedimento. En este caso, se observan las mayores concentraciones de este insecticida durante junio de 2009, diciembre de 2009 y diciembre de 2010 (Figura 5.3).



1. Cereales de invierno



2. Soja

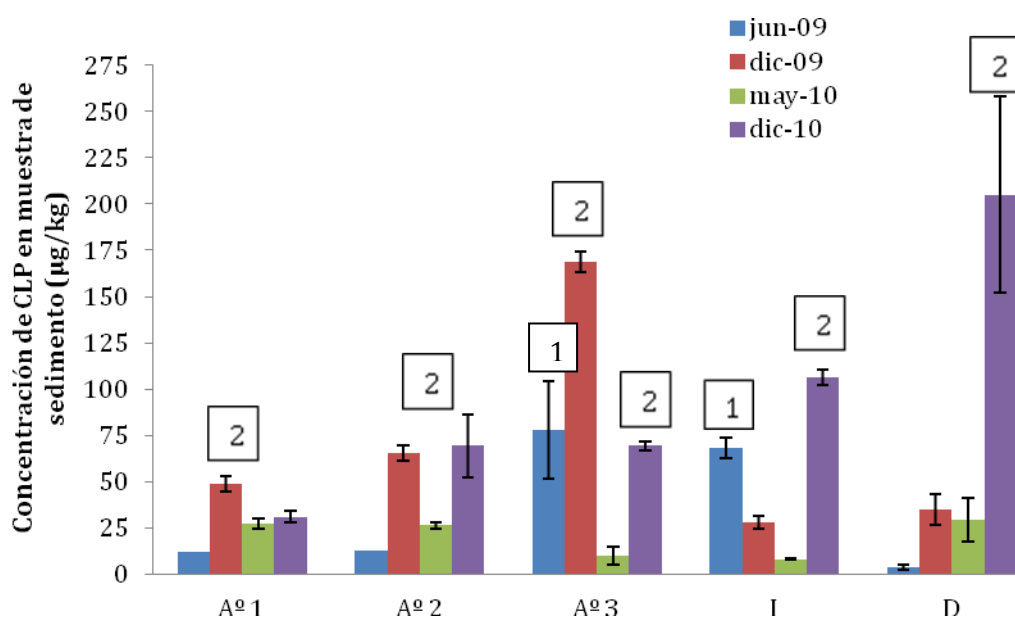


Figura 5.3. Concentraciones máximas de clorpirifos en los sedimentos ($\mu\text{g/kg}$) \pm SD y su relación con los cultivos de invierno y verano en las diferentes estaciones de muestreo del Partido de Tres Arroyos (Referencia: CLP: clorpirifos).

5.3.4. Transferencia de clorpirifos desde los sedimentos al agua

Entendiendo que la transferencia de este insecticida desde los sedimentos al agua es fundamental a la hora de comprender la distribución de clorpirifos en el ambiente, se realizó una estimación de la misma según el modelo propuesto por Gebremariam *et al.* (2011).

Los sedimentos utilizados en nuestro estudio poseen un % de materia orgánica que varía de 0,64 a 1,26 %, siendo similares a los que los autores proponen con porcentajes de desorción de 6,1 a 11,5 % y con fracciones lábiles de 23,9 a 27,5 % (Tabla 5.9). Si consideramos entonces que la fracción no lábil es aquella que puede ser liberada desde los sedimentos por procesos de desorción, y de acuerdo a lo que plantean estos autores, entonces los porcentajes de esta fracción y que se hayan relacionados con nuestros sedimentos, variarían desde 72,5 a 76,1 %.

Tabla 5.9. Valores obtenidos por Gebremariam *et al.* (2011), % Carbono Orgánico (%CO^b valores publicados por los autores que se corresponderían con los valores hallados en nuestras experiencias).

Sitio de muestreo	% CO ^b	Koc (L/kg)	Fracción lábil %	Fracción no lábil %	% desorbido
A°1/D	0,63	5569	23,9	76,1	11,5
A° 3/I	0,9	5983	25,1	74,9	6,1
A°2	1,23	3675	27,5	72,5	7

En la siguiente tabla (Tabla 5.10) se observan los valores calculados de la transferencia de clorpirifos desde los sedimentos al agua. La cantidad de este insecticida que se estaría incorporando al agua desde los sedimentos variaría en un rango de 0,0005 a 0,028 µg/l.

Tabla 5.10. Se observan los valores de clorpirifos obtenidos en las muestras de sedimentos en las cuatro campañas realizadas. Los valores señalados con (*) son los valores obtenidos del trabajo publicado por Gebremariam *et al.* (2011). Referencias: Cc: concentración, fr: fracción.

		Cc de clorpirifos en los sedimentos ($\mu\text{g/kg}$)	fr no lábil*	Cc en fr no lábil	Koc * (L/kg)	Cc desorbida ($\mu\text{g/l}$)
Junio 2009	Aº 1	12,12	76,1	9,23	5569	$1,65 \times 10^{-3}$
	Aº 2	12,49	72,5	9,06	3675	$2,46 \times 10^{-3}$
	Aº 3	77,89	74,9	58,34	5983	$9,75 \times 10^{-3}$
	I	68,07	74,9	50,98	5983	$8,52 \times 10^{-3}$
	D	3,95	76,1	3,00	5569	$5,39 \times 10^{-4}$
Diciembre 2009	Aº 1	48,91	76,1	37,22	5569	$6,68 \times 10^{-3}$
	Aº 2	65,64	72,5	47,59	3675	0,013
	Aº 3	168,91	74,9	126,51	5983	0,021
	I	28,06	74,9	21,02	5983	$3,51 \times 10^{-3}$
	D	35,21	76,1	26,79	5569	0,005
Mayo 2010	Aº 1	27,27	76,1	20,75	5569	0,004
	Aº 2	26,47	72,5	19,19	3675	0,005
	Aº 3	10,07	74,9	7,54	5983	0,001
	I	8,05	74,9	6,03	5983	0,001
	D	29,73	76,1	22,62	5569	0,004
Diciembre 2010	Aº 1	31,16	76,1	23,72	5569	0,004
	Aº 2	69,36	72,5	50,29	3675	0,014
	Aº 3	69,59	74,9	52,12	5983	0,009
	I	106,43	74,9	79,71	5983	0,013
	D	204,98	76,1	155,99	5569	0,028

5.6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos para el agua y el sedimento en las distintas campañas realizadas, podemos inferir que existe una variación estacional de las concentraciones obtenidas de clorpirifos que se relaciona con los tipos de cultivos producidos en la zona.

Los mayores valores de concentración de este insecticida en agua ($\mu\text{g/l}$) se observaron durante el 2009, en relación a los del 2010, que podrían estar indicando una disminución en el uso de este insecticida. Los asesores de la zona manifestaron el aumento del uso de los agroquímicos de la línea verde en detrimento de otros como fosforados y carbamatos. Sin embargo, para aseverar estos resultados se deberían de seguir monitoreando los arroyos de esta zona.

La falta de correlación observada entre las concentraciones de clorpirifos en el agua y en los sedimentos de los diferentes arroyos, se debería a que los sedimentos suelen ser sumideros de los pesticidas durante mucho más tiempo, en comparación con el agua.

Si bien la hidrólisis es uno de los principales mecanismos de degradación de este compuesto, en la misma influyen diversos factores como ser el pH, la temperatura, el contenido de metales, la cantidad de ácidos húmicos, arcillas, material particulado, materia orgánica y la concentración inicial aplicada (Liu *et al.*, 2001; Hui *et al.*, 2010; Gebremariam *et al.*, 2012; Alvarez *et al.*, 2013), por ello es difícil predecir la persistencia del clorpirifos en aguas y sedimentos.

Las historias de fumigación entre los arroyos 1 y 2 de Tres Arroyos parecerían ser muy similares pero no así entre el inicio y la desembocadura del arroyo Claromecó. Esto se debería a la influencia de los campos circundantes y a la llegada aguas debajo de los agroquímicos aplicados sobre los recorridos de estos arroyos.

Por otra parte, no hubo una relación directa entre la cantidad de clorpirifos y las precipitaciones registradas en los meses muestreados, mostrando entonces que existen otros factores a tener en cuenta en la contaminación por este pesticida.

5.7. REFERENCIAS

Alvarez M., du Mortier C., Sokolic T., Fernandez Cirelli A. (2013) Studies on the Persistence of a Commercial Formulation of Chlorpyrifos on an Agricultural Soil from Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Water, Air and Soil Pollution*, 224: 1571.

Anwar S., Liaquat F., Khan Q.M., Khalid Z.M., Iqbal S. (2009) Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*, 168: 400–405.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for chlorpyrifos (1997) U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp84.pdf>.

Arias-Estévez M., López-Periago E., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., Mejuto J.C., and García-Río L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 123: 247-260.

Bértola G.R., Cortizo L.C., Isla F.I. (2009) Dinámica litoral de la costa de Tres Arroyos y San Cayetano, Buenos Aires. *Rev. Asoc. Geol. Arg.*, 64 (4): 657-671.

Boivin A., Cherrier R., Schiavon M. (2005) A comparison of five pesticides adsorption and desorption processes in thirteen contrasting field soils. *Chemosphere*, 61: 668–676.

Bondarenko S., Gan J., Haver D.L., Kabashima J.N. (2004). Persistence of selected organophosphate and carbamate insecticides in waters from a coastal watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2649–2654.

Cortizo L.C., Isla F.I. (2007) Evolución y dinámica de la barrera medanosa entre los arroyos Zabala y Claromecó, partidos de San Cayetano y Tres Arroyos, Buenos Aires. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 62 (1): 03-12.

Di Marzio W.D., Sáenz M.E., Alberdi J.L., Fortunato N., Cappello V., Montivero C., Ambrini G. (2010) Environmental impact of insecticides applied on biotech soybean crops in relation to the distance from aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(9): 1907-1917.

Fang H., Yu Y., Chu X., Wang X., Yang X., Yu J. (2009) Degradation of chlorpyrifos in laboratory soil and its impact on soil microbial functional diversity. *Journal of Environmental Sciences*, 21: 380–386.

Flury M. (1996). Experimental evidence of transport of pesticides through field soils. A review. *J. Environ. Qual.* 25 (1): 25-45.

Gebremariam S.Y., Beutel M.W., Flury M., Harsh J.B., Yonge D.R. (2011) Nonsingular Adsorption/Desorption of Chlorpyrifos in Soils and Sediments: Experimental Results and Modeling. *Environ. Sci. Technol.*, 46: 869-875.

Gebremariam S. Y., Beutel M. W., Yonge D. R., Flury M., Harsh J. B. (2012) Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 215: 123-175.

Giaccio G.C.M. (2001) Ambientes ribereños de arroyos del sur y sudeste bonaerense: tipificación y comparación de algunas propiedades relevantes para el filtrado del escurrimiento superficial. Tesis para optar por el título de Magister. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Mar del Plata.

Gilani S.T. S., Ageen M., Shah H., Raza S. (2010) Chlorpyrifos degradation in soil and its effect on soil microorganisms. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 20 (2): 99-102.

Hossain M.S., Fakhruddin A.N.M., Alamgir Zaman Chowdhury M., Khorshed Alam M. (2013) Degradation of chlorpyrifos, an organophosphorus insecticide in aqueous solution with gamma irradiation and natural sunlight. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1 (3): 270-274.

Hughes D.N., Boyer M.G., Papst M.H., Fowle C.D., Rees G.A.V., Baulu P. (1980) Persistence of three organophosphorus insecticides in artificial ponds and some biological implications. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 9 (3):269-279.

Hui T.J., Ariffin M.M., Tahir N.M. (2010) Hydrolysis of chlorpyrifos in aqueous solutions at different temperatures and pH. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 14 (2): 50 – 55.

Jergentz S., Pessacq P., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. (2004) Linking in situ bioassays and dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 59: 133– 141.

Jergentz S., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. (2005) Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61: 817-826.

Junod J., Zagal E., Sandoval M., Barra R., Vidal G., Villarroel M. (2009) Chilean Journal of Agricultural Research, 69 (3): 435-444.

Lakshmi C.V., Kumar M., Khanna S. (2008) Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation, 62 (2): 204-209.

Liu B., McConnell L.L., Torrents A. (2001) Hydrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the Chesapeake Bay. Chemosphere, 44 (6): 1315-1323.

Marino D., Ronco A. (2005) Cypermethrin and Chlorpyrifos Concentration Levels in Surface Water Bodies of the Pampa Ondulada. Argentina. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 75: 820-826.

Mugni H., Ronco A., Bonetto C. (2011) Insecticide toxicity to *Hyalella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). Ecotoxicology and Environmental Safety, 74: 350-354.

Mugni H., Demetrio P., Paracampo A., Pardi M., Bulus G., Bonetto C. (2012) Toxicity persistence in runoff water and soil in experimental soybean plots following chlorpyrifos application. Bull Environ Contam Toxicol, 89(1): 208-212.

Palumbo A.J., Tenbrook P.L., Fojut T.L., Faria I.R., Tjeerdema R.S. (2012) Aquatic life water quality criteria derived via the UC Davis method: I. Organophosphate insecticides. Reviews of Environmental and Toxicology, 216: 1-49.

Peruzzo P.J., Porta A., Ronco A.E. (2008) Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. Environmental Pollution, 156(1): 61-66.

Racke K.D. (1993) Environmental fate of chlorpyrifos. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 131: 1-154.

Ronco A., Carriquiriborde P., Natale G.S., Martin M.L., Mugni H., Bonetto C. (2008) Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pampasic region. En: J. Chen & C. Guo, editors: Ecosystem Ecology Research Trends. Nova Science Publishers. Pp: 209-239.

SIIA (2013) Sistema Integrado de Información Agropecuaria. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación.
<http://www.siia.gov.ar/>

Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación (2005) Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a clorpirifos.

Vischetti C., Coppola L., Monaci E., Cardinali A., Castillo M. D. (2007) Microbial impact of the pesticide chlorpyrifos on Swedish and Italian biobeds. *Agronomy for Sustainable Development*, 27(3): 267-272.

Watson J.E. (1996) Capítulo 17: Pesticides as a source of pollution. Pollution Science, Academic Press, pp 253-277.

Watts M. (2012) Chlorpyrifos as a possible global POP for Pesticide Action Network North America.

http://www.pan-europe.info/News/PR/121009_Chlorpyrifos_as_POP_final.pdf

WHO (2009) Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides. Chlorpyrifos *O,O*-diethyl *O*- 3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate. World Health Organization. Geneva.

http://www.who.int/whopes/quality/Chlorpyrifos_WHO_specs_eval_Mar_2009.pdf

-CAPÍTULO 6-

PRESENCIA DE CLORPIRIFOS EN BIOTA ACUÁTICA DE LA LOCALIDAD DE CLAROMECO

6.1. INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas generan grandes cantidades de desechos tóxicos que son liberados al ambiente. Estos ingresan a los diferentes compartimentos de los ecosistemas, ya sea aire, agua, suelo o biota y se distribuyen en los mismos de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, movilidad y persistencia. Los cuerpos de agua reciben directa o indirectamente descargas de contaminantes como consecuencia de las diferentes actividades antrópicas que tienen lugar en las cercanías de los mismos. Los resultados de las investigaciones no dejan dudas sobre el posible riesgo de contaminación por pesticidas, ya sea por deriva durante su aplicación o por los flujos de lixiviación, lo que genera posibles consecuencias para la biota acuática y los seres humanos (Lepori *et al.*, 2013).

Históricamente, se ha creído que los compuestos organofosforados no se acumulaban en el ambiente y que eran fácilmente biodegradables. Sin embargo, hoy en día existen numerosos estudios en biota que demuestran que no solamente se bioacumulan, sino que también generan graves daños irreversibles en todos los organismos expuestos (Xu *et al.*, 2011; Watts, 2012). Por otra parte, se ha observado que no siempre los compuestos fosforados poseen una relación directa entre su concentración, en los tejidos, y el contenido lipídico de los mismos, indicando que otros factores podrían estar influyendo en la bioacumulación, como ser el tipo de compuesto (Soumis *et al.*, 2003).

El potencial genotóxico de los pesticidas organofosforados fue investigado por muchos laboratorios y hay numerosas evidencias que muestran la capacidad de estos insecticidas para inducir daño cromosómico, intercambio de cromátidas hermanas y mutación puntual. Sumado a los efectos genéticos, también se les atribuyen a los organofosforados alteraciones como deformaciones del esqueleto, daño en el hígado, riñón, intestino y corazón de animales expuestos a estas sustancias (Jorge *et al.*, 2006).

El clorpirifos, como muchos otros xenobióticos es lipofílico y en consecuencia, no soluble en agua. Se ha sugerido que posee la capacidad de acumularse en los tejidos vivos, y que de esa manera puede ocasionar un riesgo potencial para los seres humanos y otros organismos (Watts, 2012; Wang *et al.*, 2005) como peces e invertebrados. Se acumula en los compartimientos ricos en lípidos por ser detoxificado con dificultad por los organismos, que al ser difícil de excretar, persiste en los tejidos una vez que la exposición ha cesado (Aizpún, 2004 a,b). El clorpirifos induce stress oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son altamente reactivas y producen daño a moléculas biológicas, además de generar peroxidación lipídica. También causa la alteración de enzimas antioxidantes como la catalasa y produce alteraciones histopatológicas en animales intoxicados (Tongba y Damrongphol, 2011).

Los peces al igual que muchos invertebrados bentónicos son blancos de la contaminación, debido a la exposición constante de pesticidas en el medio en el que viven asociados, ya sea la columna de agua, los sedimentos de fondo o la ingestión del alimento contaminado. Estos compuestos orgánicos pueden generar en los organismos expuestos, alteraciones fisiológicas, anatómicas y comportamentales debido a su bioacumulación (Jorge *et al.*, 2006). Los peces poseen una gran superficie corporal externa, cubierta con membranas

semipermeables en contacto con el agua dónde se encuentran los contaminantes, que entran por difusión o bien a través de la dieta. Por lo que son organismos intensamente utilizados en los monitoreos ambientales debido a que son un buen reflejo del estado de los ambientes circundantes (Lanfranchi *et al.*, 2006). Existen revisiones bibliográficas recientes como la de Watts (2012) que señalan los daños de este insecticida a numerosas especies de peces, entre las que se pueden mencionar: genotoxicidad, stress oxidativo, daños al sistema inmunológico, disrupción endócrina, neurotoxicidad, entre otras. Las evidencias muestran que aún a bajas concentraciones de clorpirifos, los daños en estos animales pueden ser irreversibles. Ejemplos de ello son las investigaciones de Xing *et al.* (2012), Chandrasekara y Pathiratne (2007) y Mehler *et al.* (2008). Xing *et al.* (2012) encontraron que la carpa común presentaba daños histológicos en los tejidos del hígado y branquias a concentraciones de 1,16 µg/l de clorpirifos, habiendo sido expuestos por 40 días y aún después de 20 días de recuperación. Chandrasekara y Pathiratne (2007) analizaron para la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) la inhibición de la AChE (Acetilcolinesterasa) en el cerebro. A 2 µg/l observaron a las 48 hs un 69% de inhibición con respecto a los controles en alevines y a 4 µg/l un 74% en alevines y un 47% en sub-adultos. Mehler *et al.* (2008) estudiaron dos especies de peces *P. promelas* y *Lepomis Macrochirus* y una especie de invertebrado *Chironomus tentans*. En estas especies encontraron valores de LC50 de 5,3 µg/l para la especie *Lepomis Macrochirus*, 0,72 µg/l para *Chironomus tentans* y > 338 µg/l para *P. promelas* que resultó ser la menos sensible. Luego de dos días de exposición al clorpirifos la actividad de la AChE se redujo entre un 40-95% comparados con los controles. La actividad de la AChE para la especie *P. promelas* fue significativamente menor que la de los controles, de un 9 a un 20% para todas las concentraciones analizadas.

Por otra parte, los invertebrados bentónicos pueden contaminarse con productos químicos existentes en los sedimentos, ya sea mediante la absorción de ellos al ser ingeridos en el tracto gastrointestinal o a través de la pared del cuerpo (Di Toro *et al.*, 1991). Existen evidencias en cangrejos *Trichodactylus borellianus* que muestran cambios en la locomoción, en el consumo de oxígeno y la excreción de nitrógeno: los animales expuestos a clorpirifos mostraron la utilización de proteínas como signo de stress metabólico (Montagna y Collins, 2008).

El potencial de bioacumulación de xenobióticos varía con la especie, contenido lipídico de la misma, estado fisiológico, edad y nicho ecológico, como así también con las características del compuesto (Aizpún, 2004 a,b).

La USEPA (United States Environmental Protection Agency, 2002) estableció que el valor agudo RfD (acute Reference Dose) para el clorpirifos en los alimentos, es de 0,005 mg/kg*día y en el caso de niños y mujeres de 13-50 años de 0,0005 mg/kg*día. Se considera que, mientras que la exposición alimentaria sea inferior o igual a los valores de referencia toxicológicos (exposición \leq 100% RfD) el riesgo para la salud de los consumidores puede ser excluido con un cierto grado de certeza. Sin embargo, si la exposición alimentaria calculada supera al RfD, los efectos sobre la salud de los consumidores podrían ocurrir y el riesgo debe considerarse (EFSA, 2013).

En Argentina existen algunos monitoreos ambientales que consideran al insecticida clorpirifos y analizan su influencia sobre la biota acuática (Jergentz *et al.*, 2004, 2005; Mugni *et al.*, 2011; Sotomayor, 2011; Mugni *et al.*, 2012), pero ninguno en nuestra zona de estudio.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Durante los veranos de los años 2008 al 2011 se colectaron en el Aº Claromecó las siguientes especies: *Australoheros facetus*, *Oligosarcus jenynsii*, *Rhamdia quelen*, *Mugil liza* y *Cyrtograpsus angulatus*. Estas especies se eligieron teniendo en cuenta su abundancia en la zona y sus hábitos.

Se capturaron 5 o 6 ejemplares de cada especie de pez que fueron congelados hasta el momento de su análisis. Luego se registraron las variables de largo standard (LS) en centímetros, largo total (LT) en centímetros, peso total en gramos y se diseccionaron para obtener los siguientes tejidos: músculo, hígado, cerebro y gónadas. En los casos en los que fue posible se determinó el sexo (Figura 6.1).

Las especies *Australoheros facetus*, *Rhamdia quelen* y *Oligosarcus jenynsii* fueron recolectados durante el verano de 2008 y de 2009, *Cyrtograpsus angulatus* durante el verano de 2010 y *Mugil liza* durante el verano del 2011.

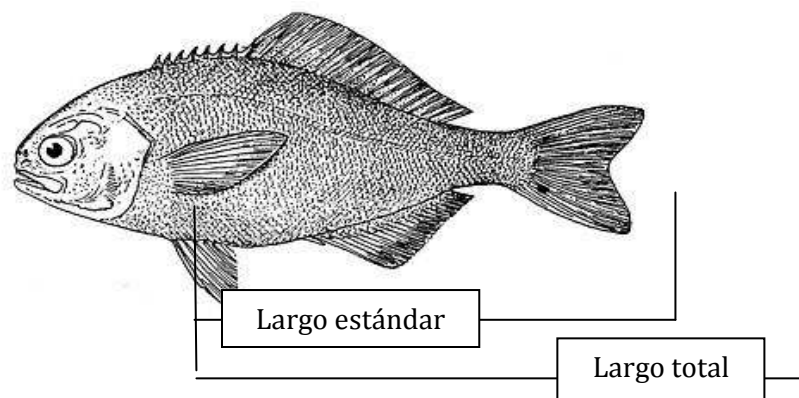


Figura 6.1. Variables registradas (LS y LT) en las distintas especies de peces.

En el caso de *Cyrtograpsus angulatus* se capturaron 14 individuos, 7 machos y 7 hembras (Figuras 6.2a y 6.2b) de los cuáles se separaron la musculatura de las branquias, que se analizaron independientemente. Además se registraron las medidas de ancho, largo y peso (Figura 6.3).

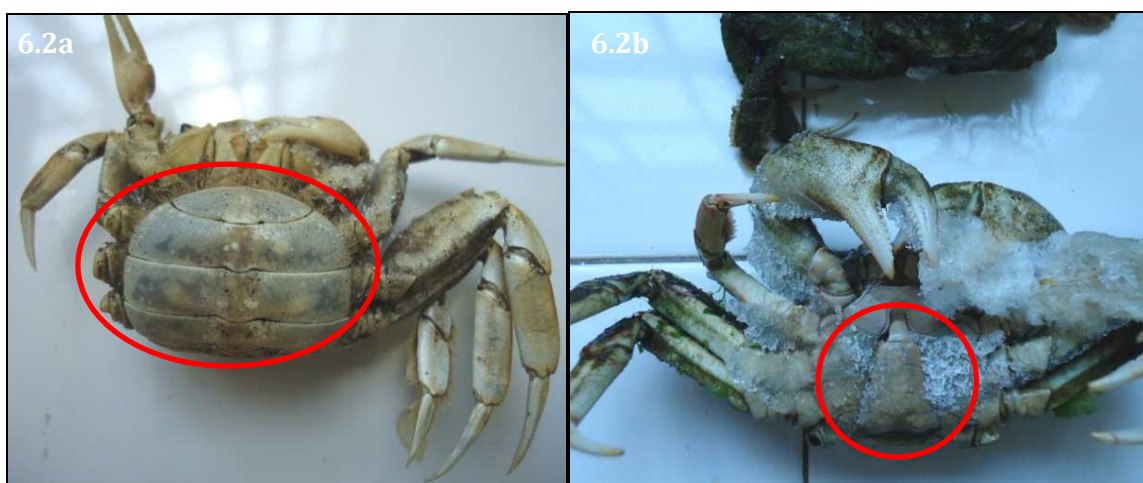


Figura 6.2a y 6.2b. Se observan las diferencias morfológicas entre los sexos de *C. angulatus* en sus caras ventrales. En la Figura 6.2a se observa una hembra y en la 6.2.b un macho de cangrejo de las rocas

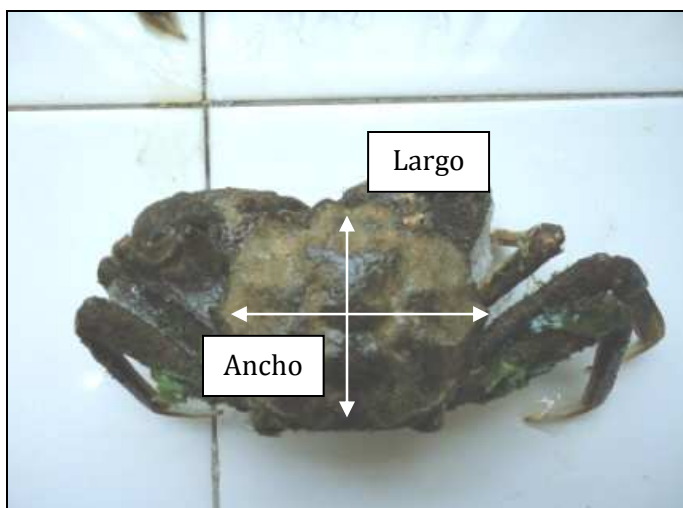


Figura 6.3. Variables morfométricas registradas en machos y hembras de *C. angulatus*.

Una vez extraídos los órganos, estos fueron envueltos en papel de aluminio y conservados a -20°C (Aizpún, 2004 a,b) (Figura 6.4). En todos los casos, los tejidos fueron pesados antes de ser procesados y analizados, y se determinó la concentración de clorpirifos en $\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo.



Figura 6.4a y 6.4b. Extracción de órganos y separación de los mismos en papel de aluminio.

6.2.1. Características biológicas de las especies estudiadas



Familia: Characidae

Nombres comunes: Dientudo

Especie: *Oligosarcus jenynsii* (Gunther, 1864)

El dientudo es una especie que se encuentra ampliamente distribuida por toda la región pampeana. Es frecuente encontrarlo en ríos y arroyos, donde puede convertirse en uno de los principales predadores en ausencia de la tararira y del bagre sapo.

Es una especie zoófaga con tendencia a la piscivoría. Este comportamiento piscívoro, solo se observa cuando alcanza tamaños muy grandes o cuando la oferta de presas es elevada. Se alimentan de pejerreyes, mojarra, madrecitas de agua y tachuelas. Su dieta varía poco entre cuerpos de agua lénticos y lóticos. Por otra parte, es frecuente encontrar material vegetal en sus contenidos estomacales, debido a que también se alimentan de invertebrados acuáticos que se desarrollan sobre o cerca de la vegetación como adultos y larvas de diversos grupos de insectos, camarones (*Palaemonetes argentinus*) y anfípodos (*Hyalella curvispina*) (Escalante, 1983).

Las hembras son más grandes que los machos (Hartz y Barbieri, 1995). La especie posee un período de desove continuo que se extiende desde Agosto hasta marzo, con un pico de actividad en primavera (Iwazkiw *et al.*, 1983). El dientudo no ha desarrollado ningún tipo de cuidado para su progenie. La especie presenta desove total que llega a ser de unas 10.000 ovas en un ejemplar adulto (Fialho *et al.*, 1998).



Familia: Mugilidae

Nombres comunes: lisa, tainha, grey mullet.

Especie: *Mugil liza* (Valenciennes, 1836)

La lisa (*Mugil liza* o *M. platanus*) es una especie eurihalina, que habita alternativamente el mar, las lagunas costeras de agua salobre y las desembocaduras de los principales cuerpos de agua desde el caribe en toda la franja oeste de Océano Atlántico (Gonzalez-Castro *et al.*, 2009; Albieri y Araújo, 2010; Gonzalez-Castro *et al.*, 2011). Mugilidae está representada por tres especies a lo largo de toda la costa del océano Atlántico sur, y en Argentina por la especie *M. liza* (o *M. platanus*) (Cousseau *et al.*, 2005; Marcotelli y Martorelli, 2009). Esta especie suele migrar desde el mar hacia las aguas estuarinas, que utilizan como nurseries y para el desarrollo gonadal (Gonzalez-Castro *et al.*, 2011).

La lisa es una especie de importancia comercial y deportiva. En Argentina se pesca de manera artesanal llegando a 250 toneladas por día (Marcotelli y Martorelli, 2009). Es fundamentalmente omnívora con tendencia iliófaga. La talla de primera madurez es de 51 cm de largo total en hembras y 49 cm en machos. Estos últimos maduran a una menor longitud que las primeras. Se han registrado hembras maduras a 42 cm y machos a 39 cm de longitud total (Gonzalez-Castro *et al.*, 2011). Es una especie con una alta fecundidad estimada en 3.080.000 oocitos (Albieri y Araújo, 2010).

Las lisas utilizan el período comprendido entre enero y mediados de abril-mayo para el crecimiento y la maduración gonadal en aguas estuarinas. A partir de mayo y hasta finales de junio se produce la migración reproductiva hacia la mar, desencadenada por la repentina disminución de la temperatura. Se produce una disminución en la alimentación, lo que resulta en un dramático coste energético y en consecuencia, una disminución de la tasa de

crecimiento. A partir de finales de septiembre (o principios de octubre) los eventos reproductivos llegan a su fin y la lisa comienza a alimentarse y a emigrar a las lagunas costeras. De esta manera el ciclo de la vida vuelve a sus inicios (Gonzalez Castro, 2009).

La alimentación cambia de acuerdo al estadio del cual se trate. Los estadios larvales y post-larvales se alimentan de plancton, mientras que los adultos se alimentan de detrito, algas y organismos bentónicos, gracias a cambios producidos en su morfología como dientes faríngeos y alargamiento del tubo intestinal (Moyle y Cech, 2004) de 5 a 7 veces la longitud corporal, que hace posible la digestión del barro orgánico.



Familia: Cichlidae

Nombres comunes: chanchita

Especie: *Australoheros facetus* (Rican y Kullander, 2006)

La chanchita es una especie que se encuentra ampliamente distribuida por toda la región pampeana. Es frecuente encontrarla en cursos de agua y lagunas, con vegetación riparia (Rosso, 2006). Presenta policromatismo dado por la dispersión o agregado de los pigmentos que se relaciona con la evasión de los predadores (Moyle y Cech, 2004).

Es una especie omnívora, los elementos animales (larvas de quironómidos, anfípodos, insectos, pequeños ejemplares de peces) son los principales componentes de su dieta (Escalante, 1984), aunque también consume algas (Gutierrez *et al*, 1986).

Es de comportamiento territorial y de cuidado parental, ya que mantiene oxigenados sus huevos con movimientos de su cola y defendiendo su nido (Sineiro de Sprechmann, 1978).

Cuando las larvas eclosionan, suelen atraparlas con sus bocas ante cualquier señal de peligro. Pueden vivir hasta 10 años y alcanzar tamaños de 180 mm de longitud (Ringuelet, 1967).



Familia: Pimelodidae

Nombres comunes: bagre sapo, bagre negro, south american catfish

Especie: *Rhamdia quelen* (Quoy y Gaimard, 1824)

El bagre negro (*Rhamdia quelen*) es un siluriforme de amplia distribución geográfica, y se extiende desde el sur de México hasta el norte y centro de Argentina (Silfvergrip, 1996). Los Silúridos son peces de piel desnuda y cuerpo deprimido, adaptados mayoritariamente a los fondos de los ambientes acuáticos. Poseen barbillas en el mentón y en los maxilares con función sensorial y aletas dorsales y/o pectorales provistas de espinas defensivas. Sus especies son conocidas en los mercados mundiales, bajo el nombre genérico de “catfish” (pez gato). Sus largas barbillas le permiten detectar la presencia de alimento a medida que recorre el fondo y ataca las presas solo cuando las detecta con las barbillas.

Habita cursos de agua dulce o lagunas costeras. Son peces planctívoros selectivos cuando larvas pero prefieren los organismos bentónicos si están presentes (Zagarese, 1988). Son omnívoros con una tendencia al generalismo. Cuando crecen se alimentan de pequeños crustáceos, moluscos, larvas y adultos de insectos y frecuentemente se encuentran en sus tractos digestivos desoves completos de pejerrey (Rosso, 2006). Puede llegar a ser un piscívoro importante, cuando alcanza tamaños grandes y cuando la oferta de presas es elevada (Ringuelet *et al.*, 1967). El período reproductivo para esta especie se inicia a finales de septiembre, culminando a fines de marzo (Luchini, 1990).

El bagre sapo posee un amplio rango de tolerancia a diversas variables ambientales, como temperatura, salinidad y pH (Marchioro y Baldisserotto, 1999). Esta especie puede sobrevivir a los inviernos fríos y crecer en el verano. En los sistemas de acuicultura, puede alcanzar los 600-800 g de peso corporal en 8 meses (Barcellos *et al.*, 2004). Es una especie muy apta para la producción acuícola, ya que posee una excelente conversión de alimento y responde bien a las técnicas de inducción y sincronización del desove a través de la inyección de hormonas sintéticas (Espinach Ros *et al.*, 1984).

Es un pez de hábitos nocturnos, lo que no evita que se lo encuentre activo en horario diurno, sobre todo si el agua presenta una alta turbidez (Piaia *et al.*, 1999). Alcanza la madurez sexual al año, desovando en primavera-verano, con múltiples puestas sin cuidado alguno y un rápido desarrollo de los embriones (Gomez *et al.*, 2000).



Familia: Varunidae

Nombres comunes: cangrejo de las rocas

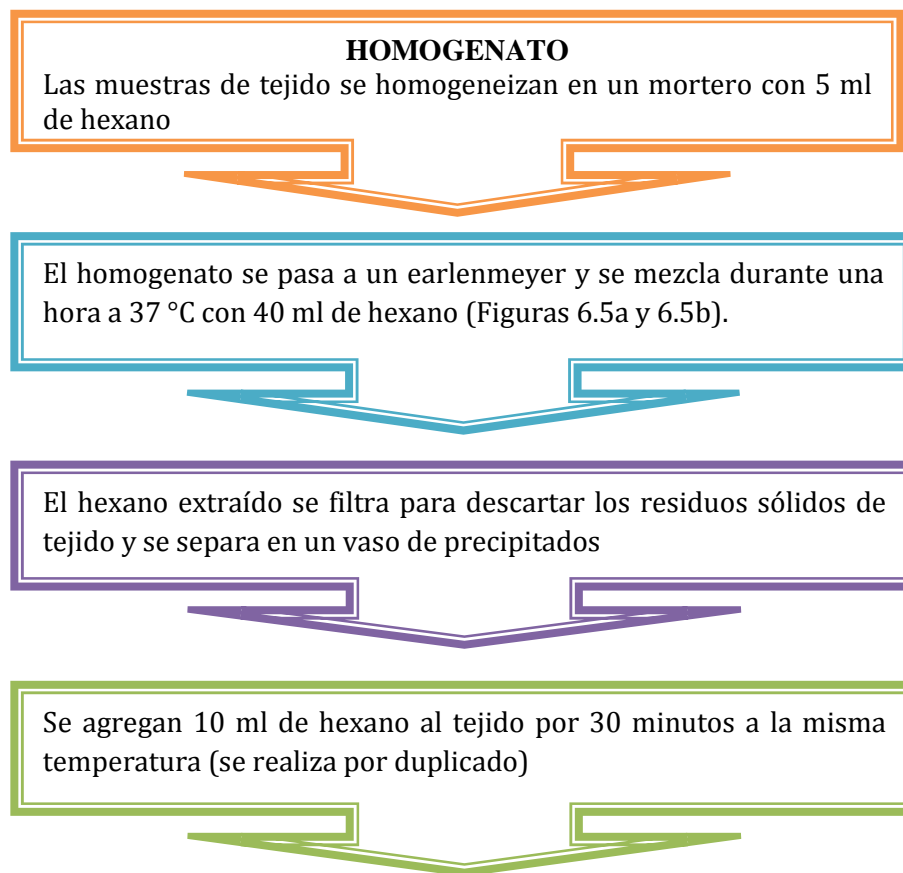
Especie: *Cyrtoagrapsus angulatus* (Dana, 1851)

Es un cangrejo carnívoro y carroñero, de hábitos más acuáticos que el cangrejo de barro *Chasmagnathus granulatus*. Los adultos se encuentran en el intermareal y submareal. Los machos forman densas concentraciones en las orillas en días de primavera-verano y es una especie que posee una alta autotomía en sus apéndices, llegando a perder más de una de sus patas en respuesta a distintos estímulos, para luego regenerarse con las siguientes mudas.

Los machos son más grandes que las hembras, como así también sus pinzas que utilizan para pelearse en la época reproductiva. Llegan a medir 60 mm, poseen un caparazón con coloración gris verdosa y la quinta pata aplanada muy densamente poblada con sedas (Spivak, 2004).

6.2.2. Extracción y análisis de clorpirifos

Para el análisis de los tejidos biológicos se procedió con el protocolo diseñado por Singh y Singh (2008). Los homogenatos se prepararon con cada órgano individual y no se procesaron pooles. Luego se determinó clorpirifos como se describe en el capítulo 2 sección 2.2.4 y 2.2.5. Se utilizó el siguiente procedimiento de extracción:



El Hexano se concentra a 5 ml en un rotavapor y se pasa por una columna con 4 g de florisil y 1 g de Na_2SO_4 , para extraer los lípidos. La columna se lava con 200 ml de una mezcla de hexano: acetato de etilo (94:6) (Figuras 6.6 y 6.7).

Se concentra a 1 ml y se cuantifica en el CGL con DCE.



Figura 6.5a y 6.5b. El homogenato en un vaso de precipitados se mezcla durante una hora a 37 °C con 40 ml de hexano.



Figura 6.6. El Hexano se concentra a 5 ml en un rotavapor.



Figura 6.7. Los 5 ml se pasan por una columna con 4 g de florisil y 1 g de Na_2SO_4 , para extraer los lípidos. La columna se lava con 200 ml de una mezcla de hexano: acetato de etilo (94:6).

6.2.3. Análisis estadístico

En todos los casos se calculó la media \pm el desvío Standard (SD). Se realizó una matriz de correlación lineal de Pearson entre los pesos, largos totales y concentración total de clorpirifos en cada una de las especies analizadas ($p < 0,05$).

En los resultados se informan primero las concentraciones de clorpirifos encontradas en cada uno de los tejidos analizados para cada una de las especies. Luego se muestran las

proporciones, en tablas y gráficos, que son las utilizadas para todas las pruebas estadísticas. Las proporciones o concentraciones relativas de clorpirifos se calcularon como la concentración del insecticida en cada órgano (Ci) sobre la concentración total hallada en cada individuo (CT), o sea Ci/CT . De esta manera, nos independizamos del peso de los animales y de otros factores asociados, como cantidad y tiempo de exposición y se hizo posible la comparación entre individuos de la misma u otra especie.

En los promedios de las proporciones de clorpirifos hallados en los distintos órganos se realizaron las pruebas de ANOVA de un factor o de dos factores con contrastes *post hoc* de Tukey y test T (LSD). En todos los casos dónde no se comprobó la homogeneidad de varianzas o la normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Liliefors) se realizó una prueba de Kruskal Wallis o de Friedman no paramétrica. Cuando no se cumplió con la homogeneidad de varianza se transformaron los datos con el logaritmo en base 10 (Sokal y Rohlf, 1995). Se utilizó el paquete estadístico BioEstat 3.0 (Ayres *et al.*, 2007).

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. Peces

6.3.1.1. Datos morfométricos

En la Tabla 6.1 se observan las medias (\pm SD) de los resultados obtenidos para las especies de peces: Largo Standard (LS), Largo Total (LT), Peso Total (PT) del tejido húmedo y concentración total de clorpirifos. También se observan los rangos de peso y largo total, además de los rangos de concentración de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$). Todos los resultados están expresados en centímetros y gramos.

Ninguna de las correlaciones realizadas mostró diferencias significativas que relacionaran las concentraciones totales de clorpirifos con los pesos o largos de los individuos de las diferentes especies. Sin embargo, en todas las especies se correlacionaron los largos totales con los pesos totales como era de esperar (resultados no mostrados). En la Tabla 6.2 se observan los coeficientes de Pearson con los respectivos p (p =probabilidad; $*p<0,05$).

En relación a la correlación de la concentración de clorpirifos con el largo o peso total de los animales analizados en este estudio, los resultados de otros autores indican que no siempre se observa una relación directa. Algunos autores observaron correlación entre la concentración de DDT y PCBs con los largos totales de cuatro especies de peces, pero no con otro clorado como el endosulfán. En el caso del clorpirifos no pudieron realizar la correlación debido a los pocos ejemplares que presentaron con este insecticida (Deribe *et al.*, 2011).

Tabla 6.1. Medias (\pm SD) de largo standard (LS), largo total (LT), peso total (PT) y concentración total de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$) para cada especie analizada. Además se presentan los rangos de largo total, peso y de clorpirifos. (Referencia: Co= concentración, CLP= clorpirifos).

Especie	LS (cm)	LT (cm)	PT (g)	Rango de LT	Rango de peso	Co total de CLP ($\mu\text{g/g}$)	Rango de Co de CLP ($\mu\text{g/g}$)
<i>O. jenynsii</i> (n=5)	11,9 \pm 0,1	15,6 \pm 0,5	35,4 \pm 2,3	13,92-46,9	13,78-47,2	0,29 \pm 0,15	0,19-0,54
<i>M. liza</i> (n=6)	25,8 \pm 1,4	31,4 \pm 1,6	310,1 \pm 44,7	29,5-33,5	262,3-369	0,30 \pm 0,14	0,09-0,46
<i>A. facetus</i> (n=5)	10,4 \pm 3,5	14,1 \pm 5,0	83,5 \pm 87,6	8,5-21,5	8,4-230,5	2,17 \pm 1,26	0,15-3,63
<i>R. quelen</i> (n=5)	18,5 \pm 4,8	22,8 \pm 5,1	127,6 \pm 92,1	12-23,5	31-265,2	1,32 \pm 1,39	0,04-3,14

Tabla 6.2. Coeficientes de la matriz de correlación de Pearson (r) entre los largos totales, pesos totales y concentración total de clorpirifos (p= probabilidad, $p < 0,05$). (Referencia: CT=concentración total).

Especie	r (Pearson) largo vs peso	p	r (Pearson) peso vs CT de clorpirifos	p	r (Pearson) largo vs CT de clorpirifos	p
<i>Oligosarcus jenynsii</i> (n=5)	0,885	0,0457	0,4115	0,4912	0,702	0,1863
<i>Mugil liza</i> (n=6)	0,978	0,0007	-0,2201	0,6751	-0,178	0,7357
<i>Australoheros facetus</i> (n=5)	0,968	0,0067	-0,028	0,9644	-0,174	0,7793
<i>Rhamdia quelen</i> (n=5)	0,949	0,0138	0,6469	0,238	0,519	0,3696

Las mayores concentraciones de clorpirifos se hallaron en las especies *Australoheros facetus* $2,17 \pm 1,26 \mu\text{g/g}$ y *Rhamdia quelen* $1,32 \pm 1,39 \mu\text{g/g}$ (Tabla 6.1), que son especies asociadas al fondo de los ambientes acuáticos. La diferencia en las concentraciones de estas especies, en comparación de aquellas que habitan la columna de agua, se debería a que los sedimentos se comportan como un sumidero de contaminantes (Aizpún, 2004b). Al permanecer más tiempo en el fondo están más expuestos a este tipo de sustancias.

Las especies *Oligosarcus jenynsii* ($0,29 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$) y *Mugil liza* ($0,30 \pm 0,14 \mu\text{g/g}$) mostraron concentraciones promedios de clorpirifos muy similares entre sí, a pesar de que las dietas de ambas especies son muy diferentes, y se esperaría que la lisa presentara una mayor concentración de clorpirifos en sus tejidos. Si bien ambas habitan la mitad superior de la columna de agua, la lisa es iliófaga y/o detritívora y pasa más tiempo asociada al fondo en comparación con el dientado, que es carnívoro. Al respecto, podrían inferirse algunas conclusiones. Por un lado, que los ejemplares de lisa en este estudio eran juveniles y poseen menores concentraciones de contaminantes en sus órganos en relación a los adultos, debido a que estuvieron menos tiempo expuestos a los tóxicos (Aizpún, 2004 a,b). Por el otro, los

juveniles de esta especie pasan menos tiempo en el arroyo de Claromecó alimentándose, debido a que luego migran al mar.

El dientado es una especie que no vive asociada al fondo de los arroyos y se alimenta de otros peces e invertebrados. Sin embargo, presentó clorpirifos en todos sus tejidos, indicando así bioconcentración y/o bioacumulación desde el agua y/o la dieta.

6.3.1.2. Análisis de las concentraciones y proporciones de clorpirifos halladas en las especies bentónicas

6.3.1.2.1. *Rhamdia quelen*

En las Tablas 6.3 y 6.4 se informan las características morfológicas, las concentraciones ($\mu\text{g/g}$) de clorpirifos y las proporciones del mismo obtenidas para cada tejido, de cada animal analizado.

La Figura 6.8 muestra las proporciones de clorpirifos en machos ($n=2$) y hembras ($n=3$) de bagre sapo en los diferentes tejidos. El ANOVA de dos factores no mostró diferencias significativas ($p=0,7217$) y cumplió con el supuesto de normalidad y homocedacia (Kolmogorov-Smirnov; $p>0,05$).

Tabla 6.3. Concentraciones ($\mu\text{g/g}$) de clorpirifos halladas en los diferentes órganos de *R. quelen* para cada uno de los ejemplares analizados. Se muestran además la media $\pm\text{SD}^*$ de cada órgano y la $\sum \text{Ci}^{**}$ para cada ejemplar.

Tejidos analizados	Hembra 1	Hembra 2	Macho 1	Hembra 3	Macho 2	Media ($\mu\text{g/g}$) $\pm\text{SD}^*$
Músculo	0,375	0,087	0,014	0	0,008	0,097 \pm 0,159
Cerebro	1,869	1,373	0,098	0,296	0	0,727 \pm 0,841
Gónadas	0,087	0,098	0,394	0,004	0	0,117 \pm 0,162
Hígado	0,809	0,905	0,058	0,067	0,027	0,373 \pm 0,443
$\sum \text{Ci}^{**}$	3,14	2,463	0,564	0,367	0,035	

Tabla 6.4. Proporciones de clorpirifos (Ci/Ct) halladas en los diferentes órganos de *R. quelen* para cada uno de los ejemplares analizados. Se observan además los largos totales (cm) y pesos totales (g). Las proporciones (Ci/CT) se estimaron calculando la relación entre la concentración de clorpirifos en cada órgano (Ci) sobre la concentración total hallada en cada individuo (CT).

Sexo	Lt (cm)	Peso (g)	Músculo	Cerebro	Hígado	Gónadas
Hembra 1	28,5	265,2	0,119	0,595	0,258	0,028
Hembra 2	22,5	103,6	0,035	0,558	0,367	0,04
Hembra 3	27	168,9	0	0,807	0,183	0,010
Macho 1	16	31	0,025	0,174	0,102	0,699
Macho 2	20	69,1	0,23	0	0,770	0
Media±SD	-	-	0,082±0,094	0,427±0,330	0,336±0,261	0,155±0,304

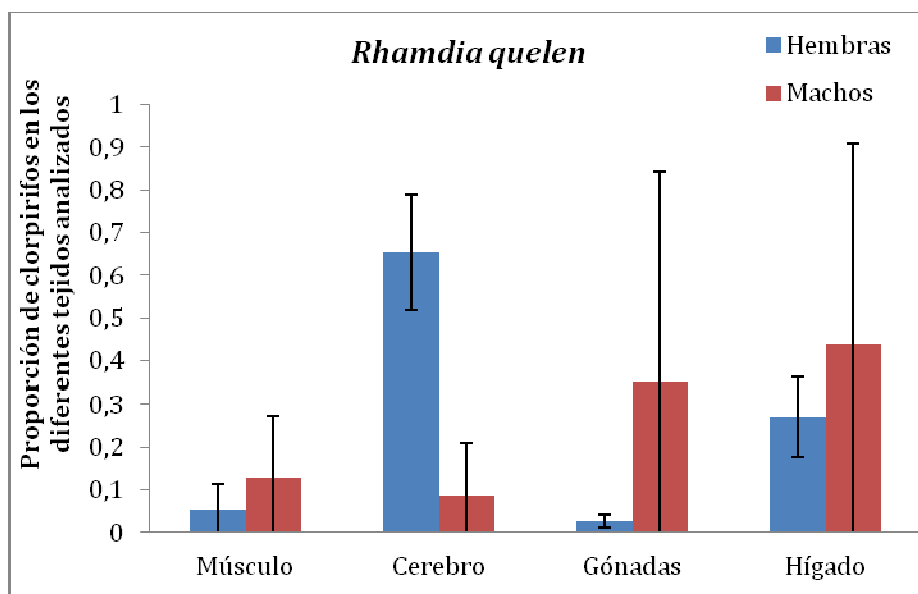


Figura 6.8. Comparación de proporciones medias de clorpirifos (\pm SD) en machos y hembras de *Rhamdia quelen*. No se observaron diferencias significativas entre las mismas.

El análisis de los promedios de las proporciones entre los diferentes órganos, sin considerar sexos, tampoco presentó diferencias significativas entre los mismos ($p > 0,05$) (Figura 6.9). Se realizó una prueba de Kruskal Wallis no paramétrica ($p = 0,1597$), debido a que los datos no cumplieron con la normalidad.

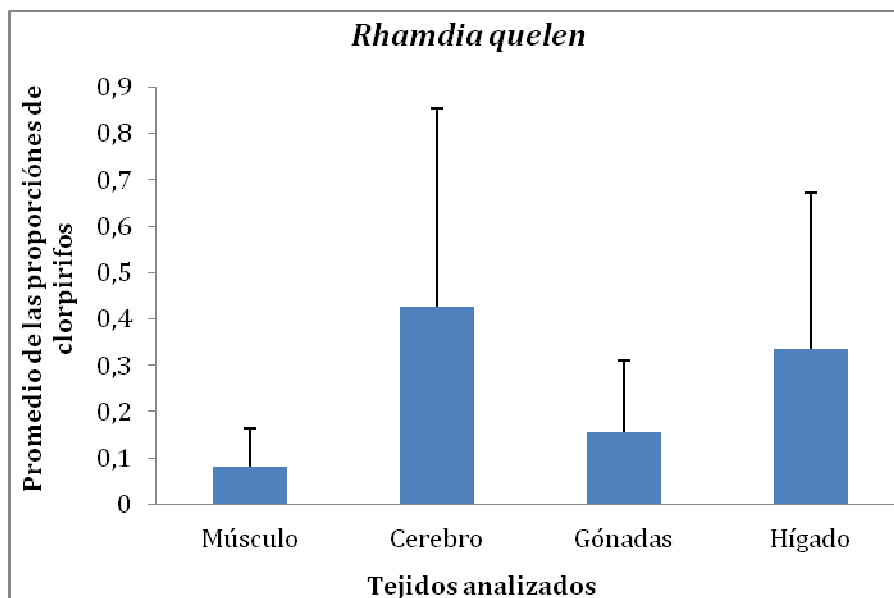


Figura 6.9. Media de las proporciones de clorpirifos en los tejidos analizados de *Rhamdia quelen* sin considerar el sexo de los ejemplares. No se observaron diferencias significativas.

Al analizar las concentraciones totales promedio ($\mu\text{g/g}$) de clorpirifos en cada uno de los sexos, se encontró que las hembras tenían mayor concentración de clorpirifos que los machos, 10 veces más, siendo los valores de 5,97 y 0,599 ($\mu\text{g/g}$).

Si bien se esperaría que las hembras tuvieran menores concentraciones, como lo observado por otros autores (Lanfranchi *et al.*, 1998, Aizpún *et al.*, 2004b), habría que considerar las fechas en que los animales fueron colectados. En nuestro caso, como ya se mencionó anteriormente, los individuos se pescaron durante la primavera-verano de 2009 que es la época reproductiva de la especie, a diferencia de los animales muestreados por Lanfranchi *et al.* (1998) y Aizpún *et al.* (2004b) que se encontraban en reposo gonadal. Debido a que la cantidad y tipo de lípidos varía con la fase de desarrollo de la cual se trate (Aizpún *et*

al., 2004b) es probable que el aumento de peso de las hembras durante la época de freza genere una mayor acumulación de clorpirifos desde la dieta. En estas se observa el abultamiento del vientre (Gomez *et al.*, 2000) dado por la acumulación de lípidos.

Por último, se analizaron los machos y las hembras por separado. Los tejidos de los machos no mostraron diferencias significativas entre sí ($p=0,799$), en cambio en las hembras la proporción de clorpirifos en cerebro fue significativamente mayor ($p=0,0015$) al resto de los órganos. El orden de concentración decreciente fue: cerebro > hígado > músculo = gónadas. (Figura 6.10) En el caso de las hembras se realizó un ANOVA de dos factores con contrastes LSD Fisher ($p<0,05$).

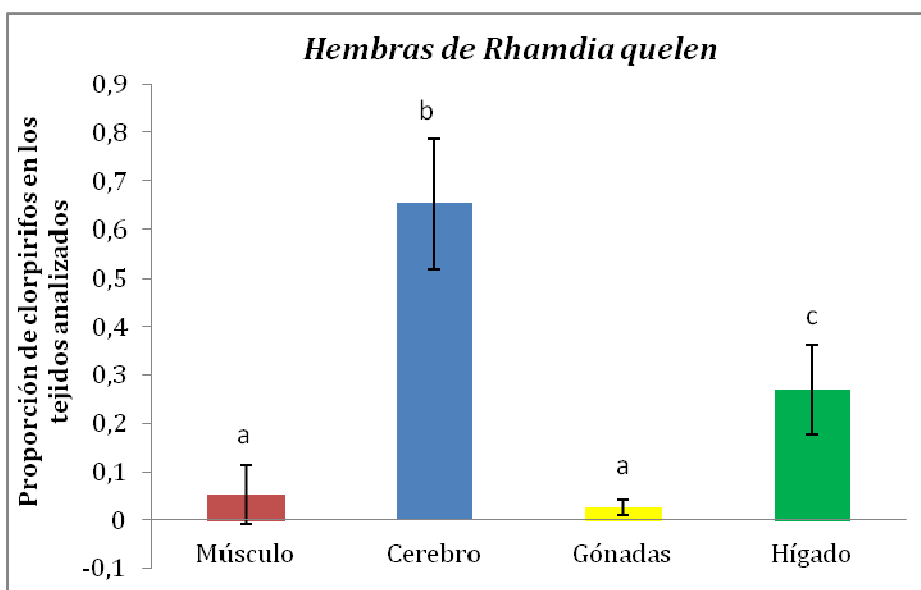


Figura 6.10. Comparación de las proporciones medias de clorpirifos (\pm SD) en hembras de *Rhamdia quelen*. Los valores con letras diferentes muestran diferencias significativas ($p<0,05$). ANOVA de dos factores con contrastes de LSD Fisher.

Para esta especie, nuestros resultados mostraron una mayor cantidad en cerebro. Entendiendo que el daño se genera donde hay una mayor acumulación de este insecticida, los riesgos para esta especie podrían ser altos. Los cambios en la actividad de la AChE afectan a la locomoción y al equilibrio de organismos expuestos, alterando los comportamientos

involucrados en la obtención de alimento, en la defensa contra predadores y en la reproducción (Miron *et al.*, 2005).

Si consideramos además que el valor de toxicidad aguda (48h-LC₅₀) en *R. quelen* para el clorpirifos es de 7,3 µg/l y que la mayor concentración registrada en las aguas del arroyo Claromecó fue de aproximadamente 3 µg/l, entonces el riesgo podría ser aún mayor si los cambios estacionales del clorpirifos no se monitorean periódicamente.

6.3.1.2.2. Australoheros facetus

En las Tablas 6.5 y 6.6 se informan las características morfológicas, las concentraciones (µg/g) de clorpirifos y las proporciones del mismo obtenidas para cada tejido, de cada animal analizado.

Tabla 6.5. Concentraciones de clorpirifos halladas en los diferentes órganos de *A. facetus* para cada uno de los ejemplares analizados. Se muestran además las medias \pm SD* de cada órgano y la Σ Ci** para cada ejemplar.

Tejidos	Hembra 1	Hembra 2	Hembra 3	Macho 4	Macho 5	Media (µg/g) \pm SD*
Músculo	0,232	0,040	0	0	0	0,055 \pm 0,101
Cerebro	0,582	0,525	0,033	0	0	0,228 \pm 0,298
Gónadas	0,982	0,613	0,120	0	1,141	0,571 \pm 0,506
Hígado	0,489	1,394	0	2,208	2,494	1,317 \pm 1,073
Σ Ci**	2,285	2,572	0,153	2,208	3,635	

Tabla 6.6. Proporciones de clorpirifos (Ci/Ct) halladas en los diferentes órganos de *A. facetus* para cada uno de los ejemplares analizados. Se muestran además los largos totales (cm) y pesos totales (g). Las proporciones (Ci/CT) se estimaron calculando la relación entre la concentración de clorpirifos en cada órgano (Ci) sobre la concentración total hallada en cada individuo (CT).

Sexo	Lt (cm)	Peso (g)	Músculo	Cerebro	Hígado	Gónadas
Hembra 1	21,5	230,5	0,102	0,255	0,214	0,43
Hembra 2	16,2	93,7	0,016	0,204	0,542	0,238
Hembra 3	13	44,8	0	0,215	0	0,786
Macho 1	11,4	40,2	0	0	1	0
Macho 2	8,5	8,4	0	0	0,686	0,314
Media±SD	-	-	0,024±0,044	0,135±0,124	0,488±0,393	0,354±0,288

En la Figura 6.11 se observan las proporciones de clorpirifos en los músculos, cerebros, gónadas e hígados de machos y hembras de *A. facetus*. Al igual que con la especie *R. quelen* no se observaron diferencias significativas entre los sexos. Se realizó un ANOVA de dos factores ($p = 0,4164$).

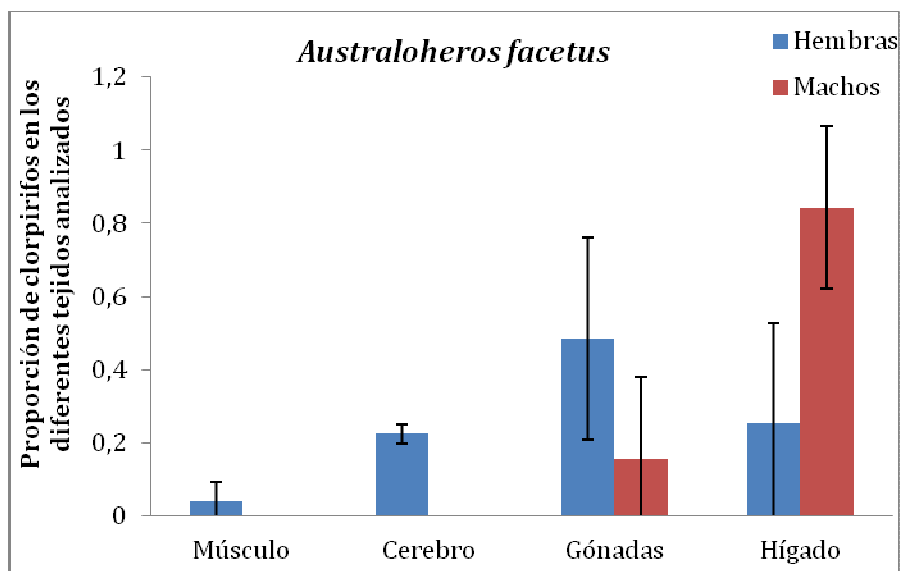


Figura 6.11. Media de las proporciones de clorpirifos en tejidos de machos y hembras de *A. facetus*. No se observaron diferencias significativas entre las mismas.

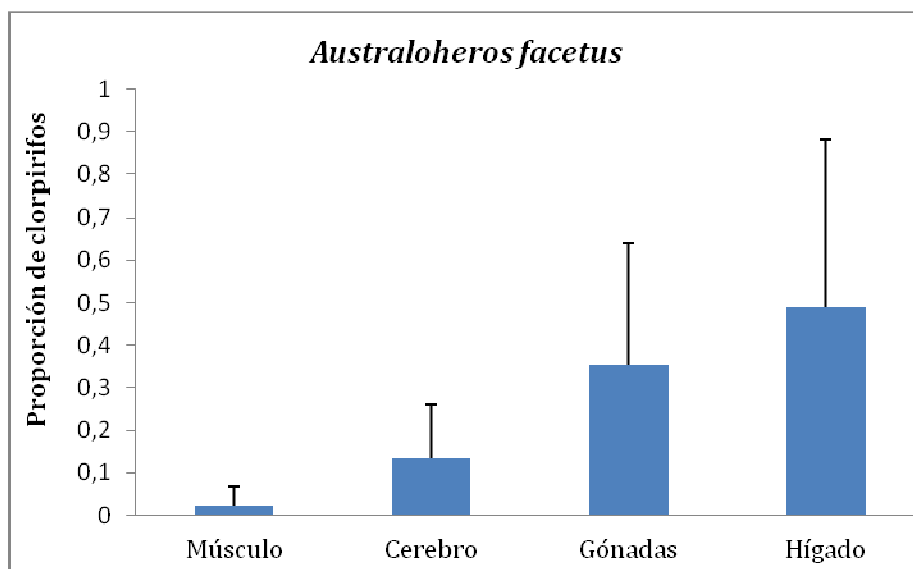


Figura 6.12. Media de las proporciones de clorpirifos en los tejidos analizados de *A. facetus* sin considerar sexo. No se observaron diferencias significativas.

El análisis de los promedios de las proporciones entre los diferentes órganos, sin considerar sexos, tampoco dio diferencias significativas entre los mismos (Figura 6.12). Se realizó una prueba de Kruskal Wallis no paramétrica ($p=0,0889$), debido a que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad. Sin embargo, en los órganos de los machos se observaron diferencias cuando el análisis se realizó para cada sexo por separado ($p=0,0462$) (Figura 6.13). En el caso de las hembras no hubo diferencias ($p=0,2252$). Se realizaron las pruebas de ANOVA de dos factores en ambos casos con contrastes LSD de Fisher.

Las concentraciones de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$) en machos se presentó en los diferentes tejidos según el siguiente orden decreciente: hígado>gónadas. La mayor concentración de clorpirifos en hígado y gónadas podría estar indicando un mayor movimiento de lípidos o bien una exposición reciente a este compuesto. Cabe mencionar que los ejemplares fueron colectados en época reproductiva. En promedio los machos presentaron el doble de concentración de clorpirifos que las hembras, siendo los valores de 2,92 y 1,67 $\mu\text{g/g}$.

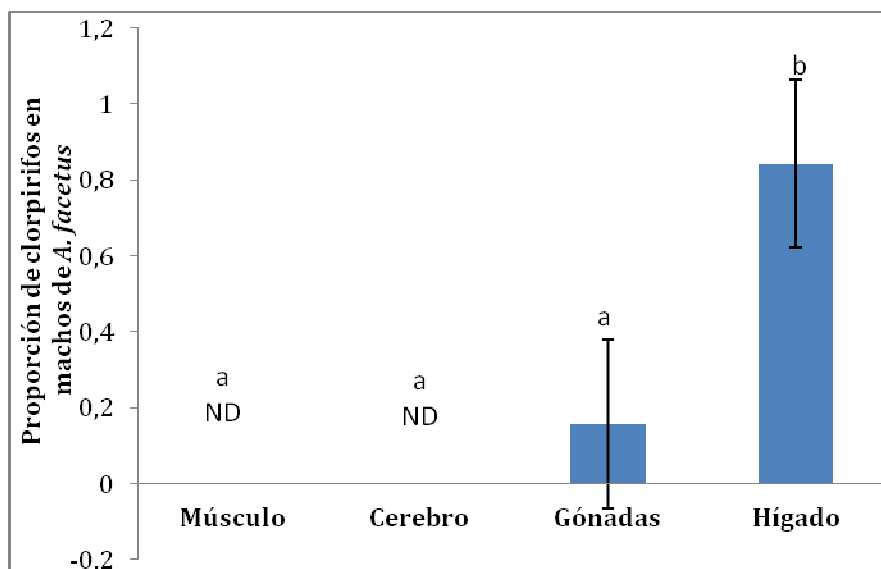


Figura 6.13. Medias de las proporciones de clorpirifos en tejidos de machos de *A. facetus*. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$). ND: no detectable.

6.3.1.2.3. Comparación de la cantidad de clorpirifos entre *A. facetus* y *R. quelen*

Cuando se compararon los promedios de las proporciones obtenidos en músculo, cerebro, gónadas e hígado entre las dos especies de fondo, no se observaron diferencias significativas ($p = 0,3268$). La prueba utilizada fue un ANOVA de dos factores (Figura 6.14).

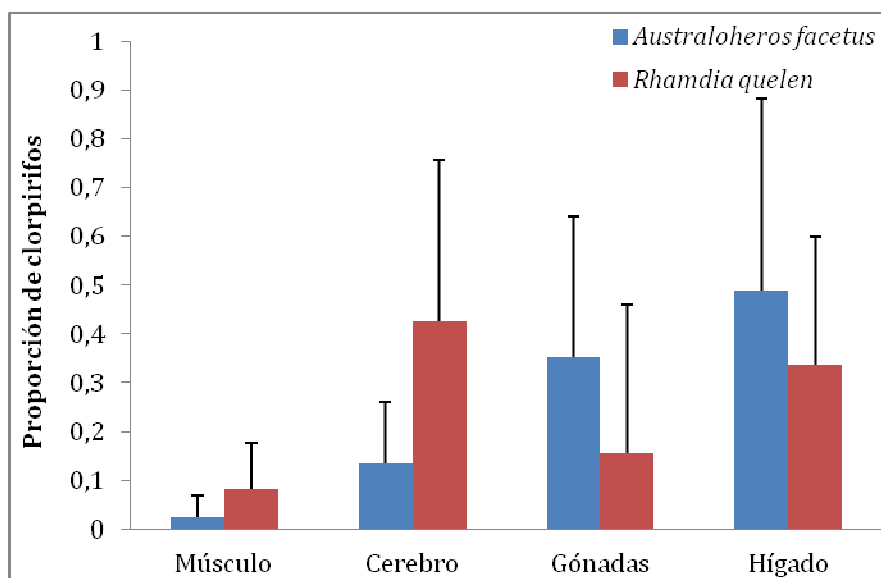


Figura 6.14. Media de las proporciones de clorpirifos en los tejidos analizados de *Australoheros facetus* y *Rhamdia quelen*. No se observaron diferencias significativas en la prueba de ANOVA de dos factores.

Por otra parte, se procedió a comparar las proporciones de clorpirifos halladas en los diferentes órganos de las hembras de *A. facetus* ($n=3$) y *R. quelen* ($n=3$) debido a que éstas poseen estrategias reproductivas muy diferentes.

La especie *Australoheros facetus* posee una escasa fecundidad, dado que las hembras de 9 cm pueden desovar aproximadamente 1.000 huevos. En cambio, una hembra de *Rhamdia quelen* de 44 cm de longitud y 1 kg de peso puede liberar 100.000 huevos y no posee ningún tipo de cuidado parental. En nuestro estudio hemos encontrado hembras de ambas especies que contenían huevos, lo que coincide con la época de desove, primavera-verano (Rosso, 2006).

Nuestros resultados muestran diferencias significativas entre las gónadas y cerebros. La proporción de clorpirifos en gónadas fue mayor para la especie *Australoheros facetus*, mientras que para *Rhamdia quelen* fue mayor en cerebro (Figura 6.15 y 6.16). Para este análisis se realizaron las pruebas de ANOVA de un factor con contrastes de Tuckey ($p < 0,01$).

El orden decreciente de proporciones hallado en los diferentes órganos de *R. quelen* fue cerebro>hígado>músculo>gónadas. En cambio para *A. facetus* fue gónadas > hígado > cerebro > músculo.

Singh y Singh (2008) analizaron la cantidad de clorpirifos en gónadas, hígado y cerebro de hembras colectadas en época reproductiva de ríos contaminados con diversos plaguicidas, entre los que se encontraba el clorpirifos. Estos autores hallaron mayor cantidad de éste compuesto en el cerebro>gónadas>hígado de la especie *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) (carpa común) y mayores concentraciones en gónadas para las especies de pez gato (catfish) *R. rita* (Hamilton, 1822) y *M. tengara* (Hamilton, 1822).

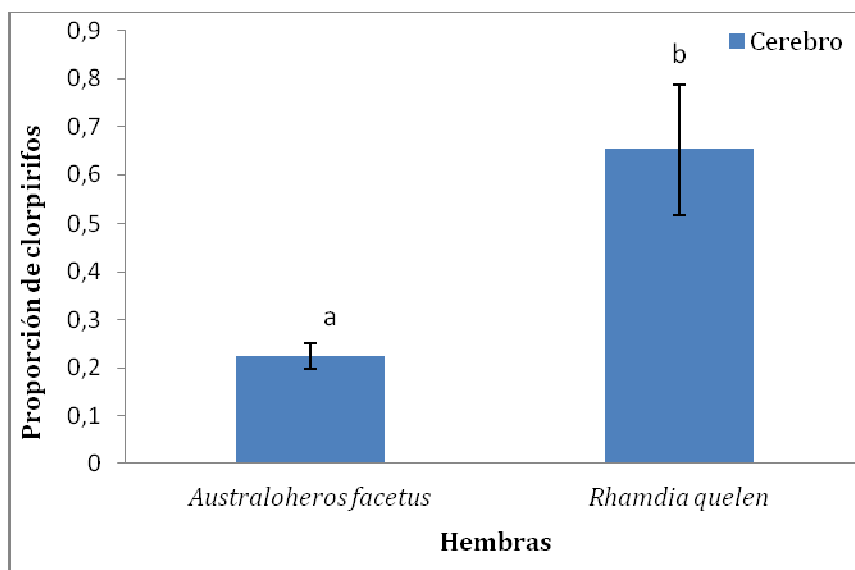


Figura 6.15. Media de las proporciones de clorpirifos (\pm SD) halladas en cerebro de hembras de *Australoheros facetus* y *Rhamdia quelen*. Las letras diferentes muestran las diferencias significativas entre los órganos (ANOVA de un factor con contrastes de Tuckey; $p < 0,01$).

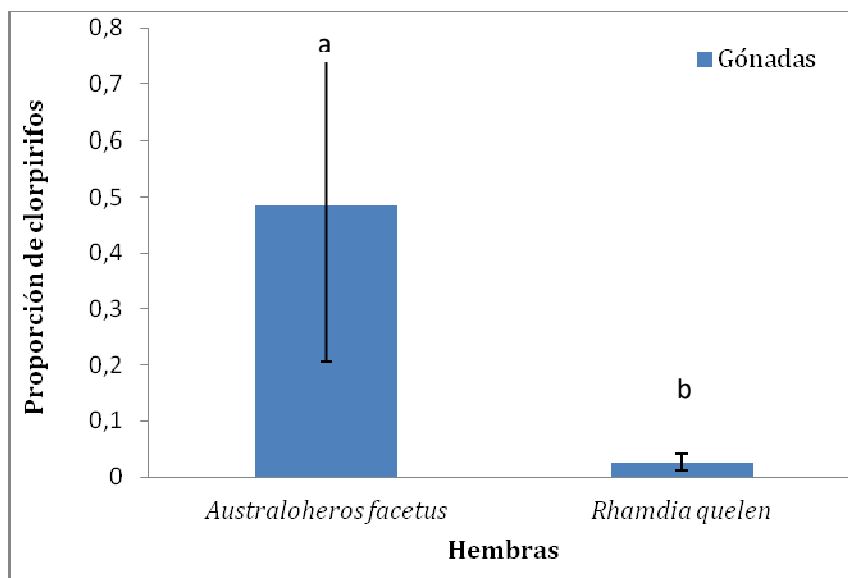


Figura 6.16. Media de las proporciones de clorpirifos (\pm SD) halladas en gónadas de hembras de *Australoheros facetus* y *Rhamdia quelen*. Las letras diferentes muestran las diferencias significativas entre los órganos (ANOVA de un factor con contrastes de Tuckey; $p < 0,01$).

6.3.1.3. Análisis de las concentraciones y proporciones de clorpirifos halladas en las especies nectónicas

6.3.1.3.1. *Oligosarcus Jenynsii*

En las Tablas 6.7 y 6.8 se informan las características morfológicas, las concentraciones ($\mu\text{g/g}$) de clorpirifos y las proporciones del mismo obtenidas para cada tejido, de cada animal analizado.

De acuerdo a Iwaszkiw *et al.* (1983) la talla de la primera madurez sexual del dientado es de 14,5 cm, aunque se han encontrado ejemplares maduros de apenas 11,5 cm. Nuestros animales presentaron rangos de largo total de 15,4-16,3 y las hembras 14,0-15,5.

Tabla 6.7. Concentraciones de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$) halladas en los diferentes órganos y ejemplares de *O. Jenynsii*. Se observan además la Media $\pm\text{SD}^*$ de cada órgano y la $\sum \text{Ci}^{**}$ para cada ejemplar.

Tejido	Macho 1	Macho 2	Macho 3	Hembra 1	Hembra 2	Media ($\mu\text{g/g}$) $\pm\text{SD}^*$
Músculo	0,02	0,079	0,023	0,015	0,006	0,029 \pm 0,029
Cerebro	0,374	0,105	0,15	0,063	0,132	0,164 \pm 0,121
Hígado	0,149	0,131	0,033	0,102	0,057	0,094 \pm 0,049
$\sum \text{Ci}^{**}$	0,543	0,315	0,206	0,18	0,195	

Tabla 6.8. Proporciones de clorpirifos (Ci/CT) halladas en los diferentes órganos de *O. jenynsii* para cada uno de los ejemplares analizados. Se observan además los largos totales (cm) y pesos totales (g). Las proporciones (Ci/CT) se estimaron calculando la relación entre la concentración de clorpirifos en cada órgano (Ci) sobre la concentración total hallada en cada individuo (CT).

Sexo	Lt (cm)	Peso (g)	Músculo	Cerebro	Hígado
Macho 1	16,112	36,38	0,036	0,688	0,275
Macho 2	16,296	37,56	0,252	0,333	0,416
Macho 3	15,378	34,58	0,114	0,728	0,159
Hembra 1	15,532	36,68	0,086	0,348	0,566
Hembra 2	14,944	31,86	0,029	0,679	0,292
Media $\pm\text{SD}$	-	-	0,103 \pm 0,090	0,555 \pm 0,197	0,342 \pm 0,155

La comparación entre las proporciones de clorpirifos en músculos, cerebros e hígados de machos y hembras de *Oligosarcus jenynsii* (Figura 6.17) no mostró diferencias significativas. Se realizó un ANOVA de dos factores ($p=0,0716$).

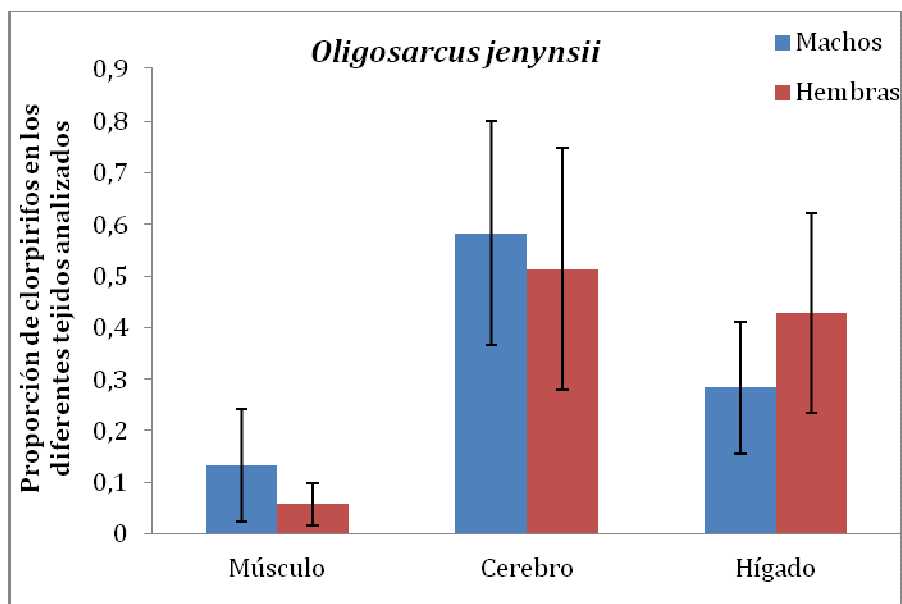


Figura 6.17. Medias de las proporciones de clorpirifos en tejidos de machos y hembras de *Oligosarcus jenynsii*. No se observaron diferencias significativas.

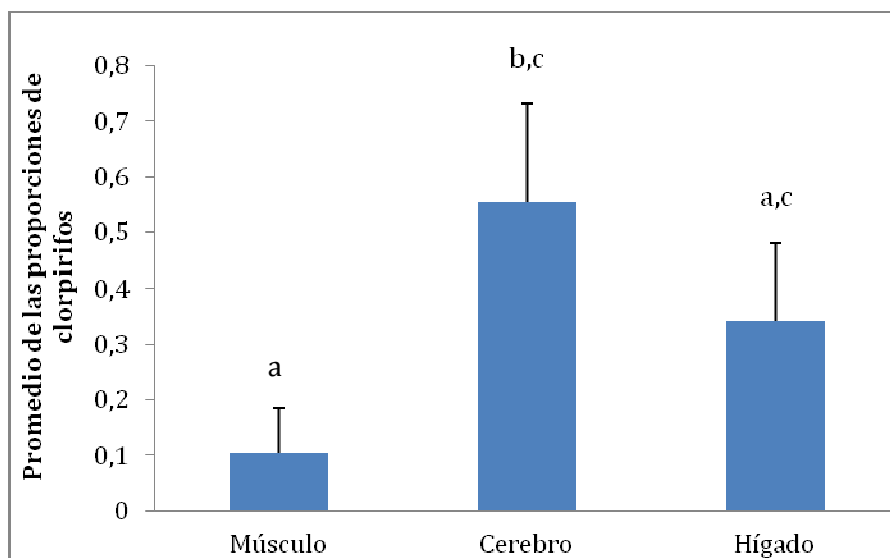


Figura 6.18. Media de las proporciones de clorpirifos en *Oligosarcus Jenynsii* (media \pm SD) en los distintos órganos (n=5) sin considerar el sexo de los ejemplares. Los valores con letras diferentes indican que son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

El análisis de los promedios de las proporciones entre los diferentes órganos, sin considerar sexo, mostró diferencias significativas entre el cerebro y músculo, no así entre el resto de los tejidos. Se realizó un ANOVA de un factor con contrastes *post hoc* de Tuckey ($p < 0,01$) (Figura 6.18). Las concentraciones de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$) se presentaron en el siguiente orden decreciente: cerebro \geq hígado \geq músculo.

Cuando se compararon los promedios de las concentraciones de machos y hembras se encontró que los machos estaban dos veces más contaminados que las hembras. Los valores fueron de 0,355 y 0,187 $\mu\text{g/g}$.

6.3.1.3.2. *Mugil liza*

En las Tablas 6.9 y 6.10 se informan las características morfológicas, las concentraciones ($\mu\text{g/g}$) de clorpirifos y las proporciones del mismo obtenidas para cada tejido, de cada animal analizado.

En este caso no fue posible determinar los sexos debido a que se trataba de organismos juveniles y no había diferenciación de las gónadas. La primera madurez se da a los 44 cm de longitud (Aizpún, 2004 a,b) y los individuos analizados variaron en el largo total en un rango que va desde 29,5-33,5 cm.

Tabla 6.9. Concentraciones de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$) halladas en los diferentes órganos y ejemplares de *Mugil liza*. Se observan las medias de las concentraciones de cada tejido con sus respectivos desvíos (Referencias: Ej: ejemplar)

Tejido	Ej 1	Ej 2	Ej 3	Ej 4	Ej 5	Ej 6	Media ($\mu\text{g/g}$) $\pm\text{SD}$
Músculo	0,054	0,007	0,031	0	0,0004	0	0,015 \pm 0,022
Cerebro	0,203	0,203	0,412	0,423	0,090	0,299	0,272 \pm 0,12
Hígado	0,009	0,005	0,019	0,008	0,001	0,027	0,011 \pm 0,009

Tabla 6.10. Proporciones de clorpirifos (Ci/Ct) halladas en los diferentes órganos de *Mugil liza* para cada uno de los ejemplares analizados. Se observan además los largos totales (cm) y pesos totales (g). Las proporciones (Ci/CT) se estimaron calculando la relación entre la concentración de clorpirifos en cada órgano (Ci) sobre la concentración total hallada en cada individuo (CT).

N° ejemplar	Lt (cm)	Peso (g)	Músculo	Cerebro	Hígado
1	29,5	273,7	0,203	0,764	0,033
2	29,9	262,3	0,033	0,942	0,025
3	30,6	277,5	0,068	0,891	0,041
4	32,6	348,1	0	0,981	0,019
5	33,5	369	0,004	0,988	0,007
6	32,2	329,9	0	0,917	0,083
Media±SD	-	-	0,051±0,079	0,914±0,082	0,035±0,026

Los resultados de la ANOVA de un factor mostraron que la proporción de clorpirifos en el cerebro era significativamente mayor al resto de los tejidos analizados ($p < 0,01$). El hígado y músculo no mostraron diferencias.

Aizpún *et al.* (2004 a,b) analizaron la concentración de varios organoclorados en músculos e hígados de juveniles de *Mugil liza*. Estos autores encontraron que en el hígado de 4 juveniles de esta especie, la sumatoria de las concentraciones de compuestos orgánicos persistentes (HCH, Heptacloro, Aldrin, Dieldrin, Endrin, α y β endosulfán, clordano y DDT) era de 0,0094 $\mu\text{g/g}$, mientras que en el músculo fue de 0,0052 $\mu\text{g/g}$.

Nuestros resultados mostraron valores promedios mayores a los registrados por estos autores (Tablas 6.9 y 6.10). El orden decreciente de las proporciones fue de: cerebro > músculo \geq hígado.

Si bien esta especie solo permanece en los ambientes estuariales desde finales de septiembre hasta principios de mayo (Gonzalez Castro, 2009), la alta concentración de clorpirifos registrada en cerebro podría estar indicando un posible daño fisiológico y/o morfológico en el tejido cerebral, provocado por un sistema de detoxificación inmaduro (Figura 6.19). Por otra parte, podría representar un riesgo para la supervivencia de las ovas y larvas. Chandrasekara y Pathiratne (2007) descubrieron que para la tilapia del Nilo

(*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) los individuos sub-adultos sufrían una inhibición de la AChE cerebral de 18–47%, y estos autores concluyeron que la concentración de AChE depende del estadio de la especie de la cual se trate debido a que las etapas más tempranas poseen menores concentraciones de enzimas de detoxificación (carboxilesterasas y Citocromo P450) lo que conllevaría a una mayor inhibición y a un mayor daño. Otros estudio realizado con metil-azinfos y carbaryl en *O. mykiss* (Walbaum, 1792) también muestra efectos significativos sobre la AChE y sobre el sistema anti-oxidante de juveniles (Ferrari *et al.*, 2007).

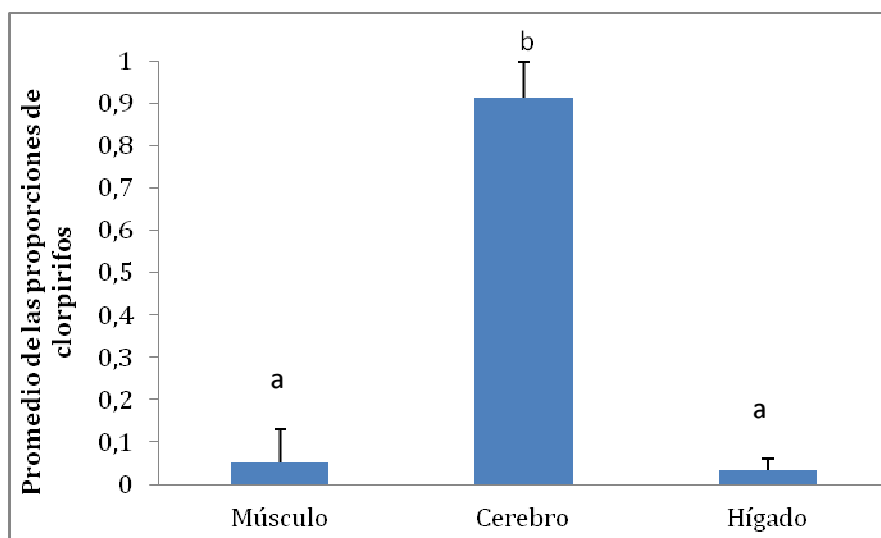


Figura 6.19. Media de las proporciones de clorpirifos en *Mugil liza* (Media \pm SD) en los distintos órganos (n=6). Los valores con letras diferentes indican que son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

6.3.1.3.3. Comparación de las proporciones de clorpirifos entre *O. jenynsii* y *M. liza*

Nuestros resultados arrojaron diferencias significativas entre las medias de las proporciones halladas en cerebros e hígados de ambas especies (Figura 6.20). En la especie *Mugil liza* el valor encontrado en cerebro fue mayor que en la especie *O. jenynsii*, siendo de $0,914 \pm 0,082$ $\mu\text{g/g}$ en el primer caso y $0,555 \pm 0,197$ $\mu\text{g/g}$ en el segundo. En cambio en el hígado, las medias de las proporciones indicaron que el dientado se hallaba más contaminado

que la lisa, siendo las proporciones halladas de $0,342 \pm 0,155$ en el primer caso y de $0,035 \pm 0,026$ en el segundo. Se realizó un ANOVA de dos factores con contrastes de Tuckey ($p < 0,05$).

En este caso no se pudo realizar una comparación entre hembras de ambas especies ya que las lisas analizadas eran juveniles inmaduros sexualmente.

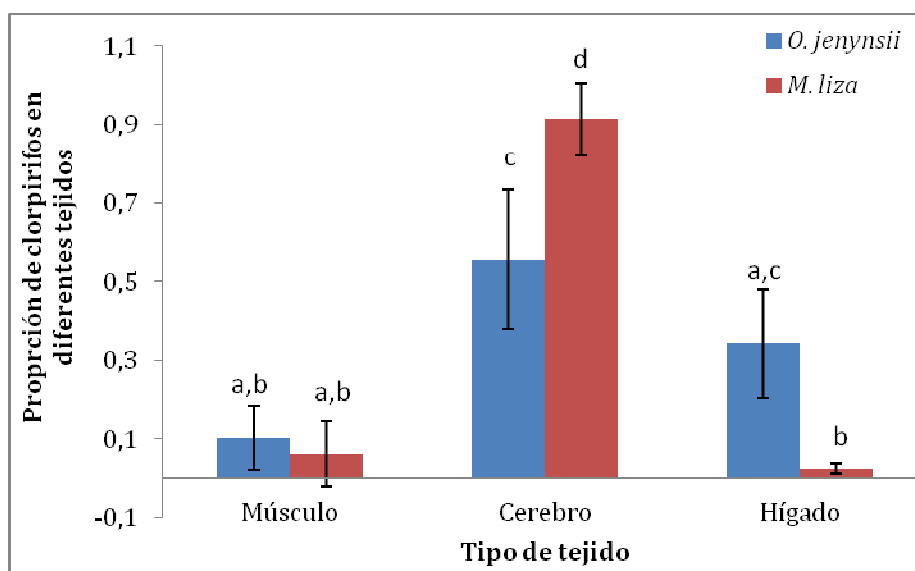


Figura 6.20. Media de las proporciones de clorpirifos en los tejidos analizados de *Oligosarcus jenynsii* y *Mugil liza*. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.3.1.4. Comparación de las proporciones de clorpirifos entre los órganos de *O. jenynsii*, *R. quelen*, *A. facetus* y *Mugil liza*

Se realizó una comparación de los medias de las proporciones de cada tejido por separado (músculo, cerebro e hígado) analizando todas las especies a la vez. En todos los casos se utilizó la prueba de ANOVA de un factor con contrastes de Tuckey ($p < 0,05$). Se observaron diferencias significativas al comparar los cerebros e hígados (Figuras 6.21 y 6.22) entre las diferentes especies, no así entre los músculos (Figura 6.23).

En el hígado se observó que el promedio de las concentraciones en *Mugil liza* fue significativamente diferente al resto de las especies, resultando ser entre 10 y 14 veces menor. Aizpún *et al.* (2004 a,b) sugieren que altos niveles de contaminantes en el tejido hepático, reflejarían un ingreso reciente de los mismos. De la misma forma se podría pensar que una alta concentración en cerebro, se relacionaría con una exposición más antigua a este compuesto.

En general, los tejidos hepáticos acumulan compuestos hidrofóbicos debido a su alto contenido de triacilglicéridos, así como los tejidos musculares, ricos en fosfoacilglicéridos, concentran compuestos más polares. La bioconcentración también depende de factores como el tipo de lípidos y la actividad metabólica del citocromo P450, asociada a las monooxigenasas de función mixta en el hígado (Aizpún *et al.*, 2004b).

En el cerebro, los juveniles de *Mugil liza* presentaron mayores concentraciones de clorpirifos de entre 2-7 veces en relación a las especies *A. facetus* y *R. quelen* y 1,6 veces a *O. jenynsii*. Los resultados de otros autores indican que debido a que el hábitat de los juveniles de ciertas especies como la lisa habitan zonas costeras altamente contaminadas, éstos podrían estar más expuestos a los pesticidas (Aizpún *et al.*, 2004b).

La especie *O. jenynsii* no mostró diferencias significativas en el cerebro con *R. quelen* pero sí con *Mugil liza* y *A. facetus*, y en este último caso la proporción hallada fue de cuatro veces mayor.

En el músculo no se observó ningún tipo de diferencias entre las concentraciones para las diferentes especies ($p=0,5314$).

Las concentraciones de clorpirifos en el tejido muscular de las distintas especies, podrían ocasionar daños a la salud de las personas que los consumen. Los claromequenses suelen pescar dientudos, bagres y lisas para su consumo dependiendo de la época del año. En relación al consumo de peces provenientes de lugares contaminados por pesticidas, se ha visto que alimentarse de los mismos contribuye a la exposición a estos compuestos (Cox, 1994), y por otra parte, existen evidencias de residuos de clorpirifos en tejidos de peces y otros organismos acuáticos consumibles por el hombre (Sun *et al.*, 2006).

Como ya se mencionó en la introducción, el ARfD para el clorpirifos es de 0,005 mg/kg *día (USEPA, 2002). Esta Dosis de Referencia Aguda es un parámetro que permite conocer cuáles son las cantidades de clorpirifos que podrían estar incorporando los ciudadanos de

Claromecó a través de una comida diaria. Para un promedio de peso de 70 kg, una persona podría consumir un máximo de 0,35 mg de clorpirifos/día ($0,005 \text{ mg/kg} \cdot \text{día}/70 \text{ kg}$).

Si bien Argentina es un país con un alto consumo de carnes rojas (85 kg/habitante/año) (Luchini, 1988), desde la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca y el CENADAC (Centro Nacional de Desarrollo Acuícola) se están llevando a cabo estudios tendientes a mejorar la producción de peces para acuicultura, fomentando así el consumo local y la exportación (SAGyP, 2013). La especie *R. quelen* se muestra interesante para producción y mercado debido a la proporción de proteínas (18%) en relación a las grasas (4%), a sus pocas espinas, a su carencia de escamas, al alto índice reproductivo, al rápido crecimiento y el relativo fácil manejo (Luchini, 1988). La producción de bagre en Argentina se concentra en Entre Ríos y Santa Fe y se exporta a Brasil, Colombia y Bolivia. En el año 2010 se exportaron unas 66 toneladas a los países antes mencionados (SAGyP, 2013). A partir de la década del 90' se observa el crecimiento de la acuicultura comercial. De una acuicultura artesanal se pasa a una índole más empresarial, al inicio de cultivos de peces y crustáceos en aguas cálido-templadas y al cultivo de moluscos bivalvos. Este crecimiento, si bien lento, es sostenido (FAO, 2005). Según la FAO el consumo de pescado por persona en nuestro país es de 5-10 Kg/año (FAO, 2012).

A pesar del bajo consumo de pescado en nuestro país, existen poblaciones locales que lo utilizan para consumo a través de la pesca deportiva o artesanal, a pesar de no ser la única fuente alimenticia. Por ende estas poblaciones locales podrían estar en riesgo al consumir pescado contaminado por pesticidas u otros contaminantes.

Tomando en cuenta el músculo de bagre (*Rhamdia quelen*), que fue el animal que presentó la mayor proporción de clorpirifos en dicho tejido, cuyo valor fue de $0,1 \text{ } \mu\text{g/g}$ ($=0,0001 \text{ mg/g}$), una persona podría consumir diariamente hasta 3 kg de pescado ($=0,35 \text{ mg/día} / 0,0001 \text{ mg/g}$).

Para una persona adulta, el riesgo asociado a consumir pescado del arroyo sería bajo. Sin embargo, para un niño que posee menor peso, las cantidades incorporadas desde la dieta podrían ser de importancia. De acuerdo a las tablas de Crecimiento del Hospital Garrahan (2011), los pesos de niñas de trece años son de aproximadamente 46 kg. Este valor corresponde al 50% del total de la población de niñas de Argentina. Si consideramos el valor

de la USEPA (2002) de 0,0005 mg/kg*día para niñas y mujeres de 13 a 50 años, la máxima concentración de clorpirifos a ser incorporada sería de 0,023 mg/día.

De acuerdo a este resultado, la cantidad de pescado que podría consumir diariamente una niña de 13 años sería de 230 gramos de bagre (0,023 mg/día /0,000097 mg/g), 1,5 kg de lisa (0,023 mg/día /0,000015 mg/g) y 767 g de dentado (0,023 mg/día/0,00003 mg/g).

Una mujer de 55 kg podría consumir hasta 0,0275 mg de clorpirifos por día, lo que equivaldría a 275 g de bagre, 1,8 kg de lisa y 917 g de dentado.

Estudios realizados en laboratorio, demuestran que los infantes son más susceptibles al clorpirifos que los adultos. Niños de menos de seis años están más expuestos a través de la alimentación, llegando a consumir dos veces más clorpirifos que los adultos (Cox, 1994).

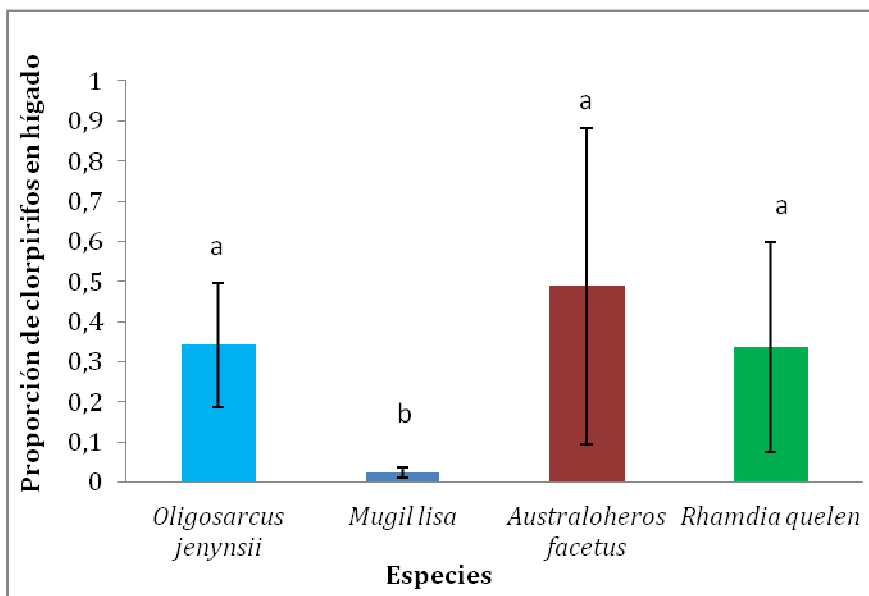


Figura 6.21. Medias de las proporciones de clorpirifos halladas en los hígados de *O. Jenynsii*, *M. liza*, *A. facetus* y *R. quelen*. Las letras diferentes indican valores significativamente distintos ($p < 0,05$).

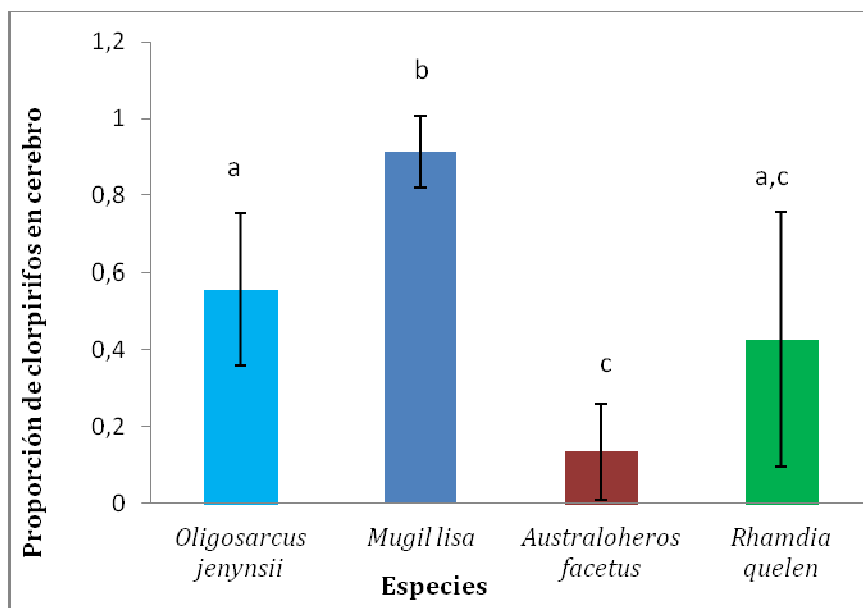


Figura 6.22. Medias de las proporciones de clorpirifos halladas en los cerebros de *O. Jenynsii*, *M. lisa*, *A. facetus* y *R. quelen*. Las letras diferentes indican valores significativamente distintos ($P < 0,05$).

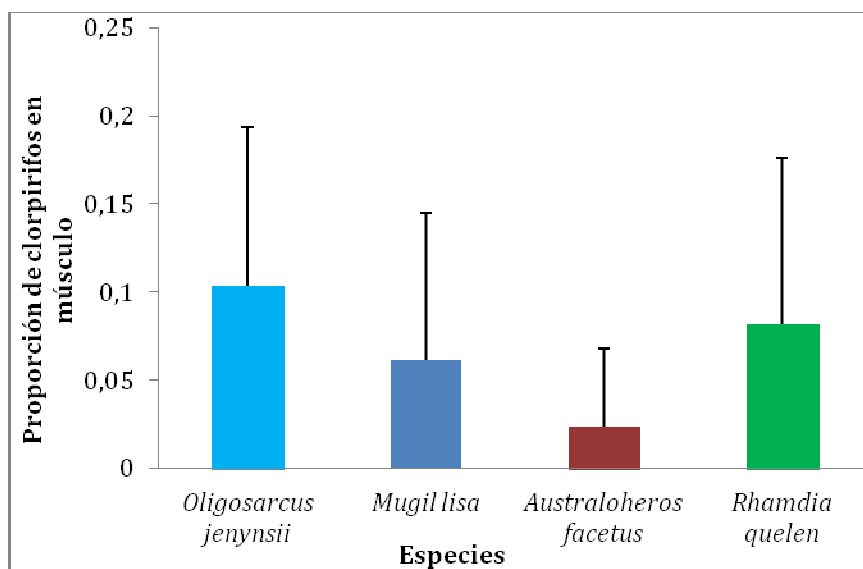


Figura 6.23. Medias de las proporciones de clorpirifos halladas en los músculos de *O. Jenynsii*, *M. lisa*, *A. facetus* y *R. quelen*. No se observaron diferencias significativas entre las medias.

6.3.2. Invertebrados: *Cyrtograpsus angulatus*

6.3.2.1. Datos morfométricos y análisis de las concentraciones y proporciones de clorpirifos halladas en los diferentes tejidos de *Cyrtograpsus angulatus*

En las Tablas 6.11, 6.12 y 6.13 se informan las características morfológicas, las concentraciones ($\mu\text{g/g}$) de clorpirifos y las proporciones del mismo obtenidas para cada tejido, de cada animal analizado.

La presencia de clorpirifos se comprobó en el 71% de las muestras de músculos y en el 43% de las muestras de branquias en los machos. En las hembras los porcentajes de detección fueron de 57% en los músculos y de 71% en las branquias. El promedio de la concentración de clorpirifos para las hembras fue de $0,084 \mu\text{g/g}$ y de $0,014 \mu\text{g/g}$ para los machos.

Se realizaron correlaciones de Pearson para analizar la existencia de algún tipo de relación entre las características morfológicas de los animales y la concentración de clorpirifos hallada en cada animal. Las correlaciones no mostraron ninguna relación entre los anchos, largos o pesos de los ejemplares y las concentraciones totales de clorpirifos. Sin embargo, se correlacionaron los datos morfométricos de machos y hembras, como era de esperarse. Los resultados de la matriz de correlación de Pearson se observan en la Tabla 6.14.

También se realizó un análisis de Friedman para comparar sexos y proporciones de clorpirifos en los distintos órganos, y una prueba de Kruskal Wallis para ver diferencias entre los órganos. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas. En la Figura 6.24 se observan las proporciones medias de clorpirifos para cada órgano en cada sexo.

Tabla 6.11. Rangos de ancho (cm), largo (cm) y peso (g) obtenidos para los machos y hembras del cangrejo de las rocas. También se observan las concentraciones totales de clorpirifos (\pm SD) y los rangos de clorpirifos total para cada sexo.

Sexo	Rango de ancho	Rango largo	Rango de peso	Co total de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$)	Rango de Co de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$)
Machos (n=7)	4,2-5,5	3,5-4,7	30,2-42,5	0,015 \pm 0,012	0,0003-0,035
Hembras (n=7)	2-3,7	2,3-3	3,9-9,4	0,084 \pm 0,096	0,002-0,293

Tabla 6.12. Concentraciones de clorpirifos ($\mu\text{g/g}$) halladas en los diferentes órganos y ejemplares de *C. angulatus*. Se observan además la Media \pm SD* de cada órgano analizado para cada sexo y la $\sum C_i^{**}$ de todos los órganos para cada ejemplar.

Tejido	Músculo	Branquias	$\sum C_i^{**}$
Hembra 1	0,023	0,270	0,293
Hembra 2	0,044	ND	0,044
Hembra 3	ND	0,067	0,067
Hembra 4	0,002	ND	0,002
Hembra 5	ND	0,106	0,106
Hembra 6	0,003	0,064	0,067
Hembra 7	ND	0,009	0,009
Media ($\mu\text{g/g}$) \pm SD*	0,010 \pm 0,017	0,074 \pm 0,096	
Macho 1	0,018	0,005	0,023
Macho 2	0,035	ND	0,035
Macho 3	ND	0,0004	0,0003
Macho 4	ND	0,014	0,014
Macho 5	0,014	ND	0,014
Macho 6	0,006	ND	0,006
Macho 7	0,006	ND	0,006
Media ($\mu\text{g/g}$) \pm SD*	0,012 \pm 0,012	0,003 \pm 0,005	

Tabla 6.13. Proporciones de clorpirifos (Ci/Ct) halladas en los músculos y branquias de *C. angulatus* para cada uno de los ejemplares analizados. Se observan además los largos (cm), anchos (cm) y pesos totales (g). Las proporciones (Ci/CT) se estimaron calculando la relación entre la concentración de clorpirifos en cada órgano (Ci) sobre la concentración total hallada en cada individuo (CT).

Sexo	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso (g)	Músculo	Branquias
Hembra 1	3,6	3	9,4	0,078	0,922
Hembra 2	3,3	2,5	7,5	1	0
Hembra 3	3,4	2,6	8,9	0	1
Hembra 4	3,7	2,8	9,6	1	0
Hembra 5	3,1	2,5	5,4	0	1
Hembra 6	3	2,5	7,6	0,050	0,950
Hembra 7	2	2,3	3,9	0	1
Media±SD	3,2±0,6	2,6±0,2	7,5±2,1	0,304±0,476	0,696±0,476
Macho 1	4,2	3,5	30,2	0,788	0,212
Macho 2	4,5	3,7	29,9	1	0
Macho 3	4,3	3,5	28	0	1
Macho 4	5,5	4,5	42,5	0	1
Macho 5	5	4,2	30,5	1	0
Macho 6	5,1	4,7	39,2	1	0
Macho 7	4,9	4,4	34,4	1	0
Media±SD	4,8±0,5	4,07±0,5	33,5±5,4	0,684±0,474	0,316±0,474

Tabla 6.14. Se observan los coeficientes de la matriz de correlación de Pearson (r) entre los largos, anchos, pesos y concentración total de clorpirifos con sus respectivos $p < 0,05$. (Referencias: CLP: clorpirifos)

Sexo	Datos de la matriz de correlación de Pearson	Ancho vs largo	Ancho vs peso	Ancho vs CT de CLP	Largo vs peso	Largo vs CT de CLP	Peso vs CT de CLP
Machos	r (Pearson)	0,9135	0,8672	-0,2543	0,8424	-0,3705	-0,2248
	$p < 0,05$	0,004	0,0115	0,5822	0,0173	0,4133	0,6279
Hembras	r (Pearson)	0,8129	0,9055	0,3756	0,8315	0,6806	0,3342
	$p < 0,05$	0,0262	0,005	0,4063	0,0204	0,0923	0,4638

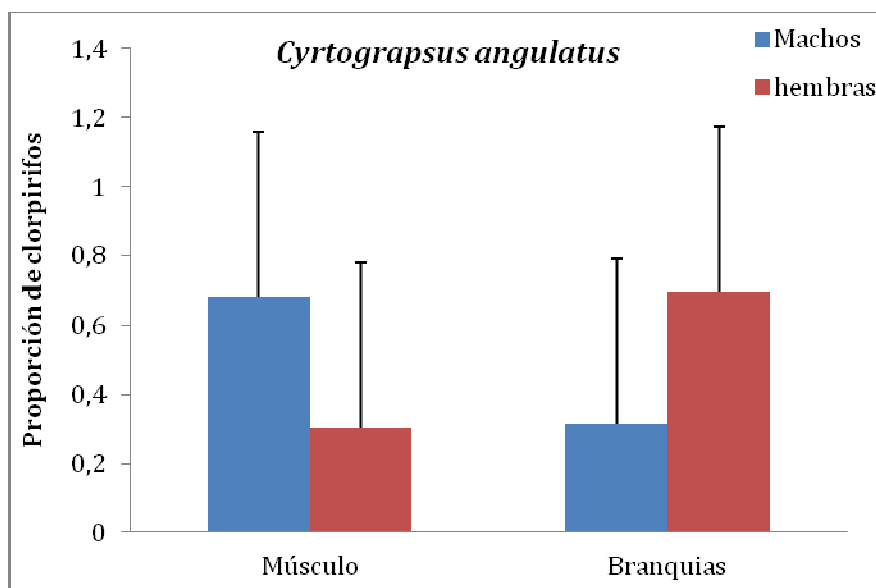


Figura 6.24. Media de las proporciones de clorpirifos en los tejidos analizados de *Cyrtograpsus angulatus*. No se observaron diferencias significativas en la prueba de Friedman ($X^2=3,0857$) ($p=0,3786$).

Es importante considerar que la concentración de clorpirifos en el agua del arroyo Claromecó al momento del muestreo fue de $1,96 \pm 0 \mu\text{g/l}$ y de $35,20 \pm 8,43 \mu\text{g/kg}$ en los sedimentos. Existen evidencias en otras especies de cangrejos que demuestran que a las concentraciones halladas de clorpirifos en Claromecó, los daños que se producen sobre estos animales son de importancia. Se pueden mencionar dos ejemplos como el estudio de SenthilKumar *et al.* (2007) y Tongbai y Damrongphol (2011). En el primer caso, expusieron a cangrejos de la especie *Spiralothelphusa hydrodroma* (Herbst, 1794) a $2 \mu\text{g/l}$ de clorpirifos 20% (formulado comercial) durante 15 y 30 días. Estos autores observaron cambios significativos con los controles en las enzimas Succinato deshidrogenasa (SDH), fosfatasa ácida (ACP) y fosfatasa alcalina (ALP). En el caso de la SDH se observaron disminuciones a nivel del ganglio torácico y pedúnculo ocular. La disminución de esta enzima oxidativa respiratoria, según los autores, sugiere un metabolismo anaeróbico para hacerle frente a la demanda energética durante la exposición a éste contaminante. La ACP disminuyó en el cerebro y el ganglio torácico pero aumentó en el pedúnculo ocular. Sus cambios responderían a alteraciones producidas en el metabolismo debido a la presencia de clorpirifos. La ALP disminuyó en el cerebro y ganglio torácico. Esta enzima se reportó en el metabolismo del glucógeno, en el transporte activo, en la síntesis de proteínas y de enzimas y en la actividad secretoria. Por ende, cualquier cambio de la misma podría estar afectando a los organismos. Por otra parte, Tongbai y Damrongphol (2011) encontraron que la especie de crustáceo de agua dulce *Macrobrachium lanchesteri* (De Man, 1911) expuesta por 96 hs a $1,5 \mu\text{g/l}$ de clorpirifos (99,5% pureza) en agua mostraba inhibición de la AChE *in vivo* y cambios histopatológicos en células de branquias e hígado, en las cuales se observaban engrosamientos y degeneración de las mismas. También observaron stress oxidativo dado por el aumento de TBARS (peroxidación lipídica) y disminución de la enzima catalasa.

Se ha visto que a mayores concentraciones de clorpirifos se observan cambios en la respiración, en la excreción de amonio y en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas en el cangrejo *Trichodactylus borellianus* (Nobili, 1896), así como también en sus comportamientos de locomoción (Montagna & Collins, 2008).

El invertebrado *Cyrtograpsus angulatus* es una especie de importancia en la cadena trófica del arroyo Claromecó. Es importante destacar que esta especie es consumida por diversas especies de aves típicas del arroyo como: el Macá de pico grueso (*Podilymbus*

podiceps), la gallineta común (*Pardirallus sanguinolentus*) y Pitotoy chico (*Tringa flavipes*) (Fangauf y Winkler, 1998).

6.4. CONCLUSIONES

El clorpirifos fue detectado en todas las muestras de tejidos analizadas.

La concentración de clorpirifos varió con el tipo de tejido y el contenido graso de los mismos, sugiriendo *bioacumulación* de éste en la biota acuática. En todas las especies de peces analizadas se observó una mayor concentración del insecticida en cerebro, hígado y gónadas.

Las mayores concentraciones se hallaron en ejemplares de *R. quelen* (Bagre sapo) y *A. facetus* (Chanchita), especies que viven asociadas al fondo, sugiriendo que el hábitat de las especies es de suma importancia en la concentración de Clorpirifos hallada en sus tejidos.

En *O. jenynsii* y *A. facetus* se observó que los machos se encontraban el doble de contaminados que las hembras. Estos resultados podrían relacionarse con la detoxificación natural que sufren las mismas luego de la época reproductiva, además de otros factores como el contenido lipídico aportado por la dieta, la biotransformación y el crecimiento.

En la especie *R. quelen* se registró una concentración en hembras que fue 10 veces la registrada en machos. Esta diferencia podría estar relacionada con el hecho de que las hembras son más grandes que los machos y más aún durante la época de freza, en donde se observa que las mismas poseen un abultamiento de su vientre dado por una mayor acumulación de lípidos. Estos ejemplares fueron colectados durante la época reproductiva.

Las concentraciones halladas de clorpirifos en las distintas especies de peces, presentaron un promedio de 1,3 µg/g en *R. quelen*, 2,2 µg/g en *A. facetus*, de 0,3 µg/g en *M. liza* y de 0,3 µg/g en *O. jenynsii*. Las mismas son superiores a las publicadas por otros autores en otras especies de peces y no se observó ningún tipo de correlación entre los pesos y largos totales con las concentraciones halladas de clorpirifos, posiblemente debido al bajo número de especímenes considerados. Por otra parte, se ha observado que no siempre los compuestos fosforados poseen una relación directa entre su concentración, en los tejidos, y el contenido lipídico de los mismos, indicando que otros factores podrían estar influyendo en la bioacumulación, como ser el tipo de compuesto.

Cabe mencionar que todas las especies analizadas en este trabajo frecuentan el fondo para alimentarse y/o reproducirse, con excepción del dientado, y que las concentraciones de clorpirifos en los sedimentos halladas en este estudio fueron de 205 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el arroyo Claromecó. En la actualidad no existen estudios que demuestren cuánto de este pesticida se incorpora a través de la alimentación en alguna de las especies consideradas en este trabajo.

En relación al consumo de peces pertenecientes a lugares contaminados por pesticidas, se ha visto que alimentarse de los mismos contribuye a la exposición de este compuesto, ya que existen evidencias de residuos de clorpirifos en tejidos de peces y otros organismos acuáticos consumibles por el hombre.

En el caso del cangrejo de las rocas, el promedio de la concentración de clorpirifos para las hembras fue de 0,084 $\mu\text{g}/\text{g}$ y de 0,014 $\mu\text{g}/\text{g}$ para los machos. Las hembras presentaron una mayor concentración de clorpirifos en las branquias, mientras que en los machos fue mayor en el músculo.

En relación a las otras especies analizadas, los cangrejos presentaron menores concentraciones de este insecticida y esto podría estar relacionado con el menor tiempo de vida y los mecanismos de detoxificación de la especie.

Es necesario profundizar los estudios en biota acuática para comprender la diseminación de este compuesto en el ambiente a través de las cadenas tróficas, ya que esto podría generar un riesgo potencial para la salud humana y para los ecosistemas acuáticos. Los primeros resultados obtenidos sugieren que es necesario repetir estas experiencias incluyendo un mayor número de individuos adultos de ambos sexos y juveniles, para poder relacionar la ecología de las especies, la variación de la dieta, el tamaño corporal, el estadio de vida con la cantidad de clorpirifos hallada en sus tejidos.

6.5. REFERENCIAS

Aizpún J., Moreno V., Gerpe M., Miglioranza K.S.B., Gonzalez M., Ondarza P. (2004a) "Plaguicidas organoclorados y metales pesados en la biota del Río de la Plata y su Frente Marítimo" 2° informe de avance, Proyecto PNUD/GEF/RLA/99/G31, Acuerdo 082.

Aizpún J., Moreno V., Gerpe M., Miglioranza K.S.B., Gonzalez M., Ondarza P. (2004b) "Plaguicidas organoclorados, bifenilos policlorados y metales pesados en la biota del Río de la Plata y su Frente Marítimo" Informe Final, Proyecto PNUD/GEF/RLA/99/G31, Acuerdo 082.

Albieri R. J., Araújo F.G. (2010) Reproductive biology of the mullet *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in a tropical Brazilian bay. *Zoología*, 27(3): 331–340.

Ayres M., Ayres M., jr. Ayres D.L., de Assis Santos dos Santos A. (2007). Aplicaciones estadísticas para el área de la Ciencias Biomédicas. Belém, Pará, Brasil.

Barcellos L.J.G., Kruetz L.C., Quevedo R.M., Fioreze I., Cericato A.B.S., Ritter F. (2004) Nursey rearing of jundia', *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement, *Aquaculture* 232: 383–394.

Chandrasekara L.W.H.U., Pathiratne A. (2007) Body size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by chlorpyrifos and carbosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 109–119.

Cousseau M.B., González-Castro M., Figueroa D.E., Gosztonyi A.E. (2005) ¿Está presente *Mugil liza* Valenciennes 1836 (Teleostei: Mugiliformes) en aguas argentinas? *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40 (2): 127-131.

Cox C. (1994) Chlorpyrifos, Part 1: Toxicology. *Journal of pesticide reform*, 14 (4): 15-19.

Deribe E., Rosseland B.O., Borgstrøm R., Salbu B., Gebremariam Z., Dadebo E., Norli H.R., Eklo O.M. (2011) Bioaccumulation of persistent organic pollutants (POPs) in fish species from Lake Koka, Ethiopia: The influence of lipid content and trophic position. *Science of the Total Environment* 410-411:136–145.

Di Toro D.M., Zarba D.J., Hansen D.J., Berry W.J., Swartz R.C., Cowan C.E., Pavlou S.P., Allen H.E., Thomas N.A., Paquin P.R. (1991) Technical basis for establishing sediment quality criteria for non ionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 1541–1583.

EFSA (2013) *EFSA Journal* 2013, 11(3): 3130.

<http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/3130.pdf>

Escalante A.H. (1983) Contribución al conocimiento de las relaciones tróficas de peces de agua dulce del área platense, II, Tetragonopteridae. *Limnobios* 2(6): 379-402.

Escalante A.H. (1984) Contribución al conocimiento de las relaciones tróficas de peces de agua dulce del área platense, IV, dos especies de Cichlidae y misceláneas. *Limnobios* 2(8): 562-578.

Espinach Ros A., Amutio V.G., Mestre Arceredillo J.P., Orti G., Nani A. (1984) Induced breeding of the South American catfish, *Rhamdia sapo* (C. & V.) *Aquaculture* 37: 141-146.

Fangauf R.A., Winkler M. (1998) Aves de Claromecó, Amigos de la Tierra.

FAO (2005) Resumen informativo sobre la pesca por países, la República Argentina. ftp://ftp.fao.org/FI/DOCUMENT/fcp/es/FI_CP_AR.pdf

FAO (2012) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma.

<http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf>

Ferrari A., Venturino A., Pechén de D'Angelo A.M. (2007) Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88: 134-142.

Fialho C.B., Schifino L.C., Verani J.R. (1998) Biología reproductiva de *Oligosarcus jenynsii* (Gunther) (Characiformes, Characidae) da Lagoa das Custodias, Tramandaí, Rio Grande do sul, Brasil.

Gomes L., Golombieski J.I., Chippari Gomes A.R., Baldisserotto B. (2000) Biología do Jundia *Rhamdia quelen* (teleostei, Pimelodidae). *Ciencia Rural* 30(1): 179-185.

Gonzalez Castro M., Abachian V., Perrotta R.G. (2009) Age and growth of the striped mullet, *Mugil platanus* (Actinopterygii, Mugilidae), in a southwestern Atlantic coastal lagoon (37° 3'S-57°19'W): a proposal for a life-history model. *Journal Applied Ichthyology*, 25: 61-66.

Gonzalez Castro M., Macchi G.J., M. B. Cousseau M.B. (2011) Studies on reproduction of the mullet *Mugil platanus* Günther, 1880 (Actinopterygii, Mugilidae) from the Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina: Similarities and differences with related species. *Italian Journal of Zoology*, 78(3): 343-353.

Gutierrez M., Bistoni M., Haro J.G. (1986) Hábitos alimentarios de *Cichlosoma facetus* (Jenyns) (Pisces, Cichlidae) en el Río Primero (Córdoba, Argentina). Revista de la Asociación de Ciencias naturales del Litoral, 17(1): 115-126.

Hartz S.M., Barbieri G. (1995) Crescimento do peixe-cachorro, *Oligosarcus jenynsii* (Gunther, 1864) na lagoa Caconde; Rio Grande do Sul, Brasil (Teleostei, Characidae), Boletim do Instituto de Pesca Sao Paulo, 22(2): 33-40.

Iwaszkiw J.M., Freyre L.R., Sendra E.D. (1983) Estudio de la maduración, época de desove y fecundidad del dientado *Oligosarcus jenynsii* (Pisces, Characidae) del embalse Río tercero, Córdoba, Argentina. Limnobios, 2(7): 518-525.

Jergentz S., Pessacq P., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. (2004) Linking in situ bioassays and dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. Ecotoxicol. Environ. Saf., 59: 133– 141.

Jergentz S., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. (2005) Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. Chemosphere, 61: 817–826.

Jorge L.C., Casuso J.A., Cowper Cole F.F., Fabiola F., Sánchez S. (2006) Análisis preliminares de los efectos genotóxicos del malatión. Resumen V-016, Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y tecnológicas.

Lanfranchi A.L., Aizpún de Moreno J.E., Moreno V.J., Metcalfe T.L., Menone M.L. (1998) Distribution of Organochlorine Compounds in Tissues of Croaker (*Micropogonias furnieri*) from Samborombón Bay, Argentina. Environmental Sciences, 6: 55-067.

Lanfranchi A.L., Menone M.L., Miglioranza K.S.B., Janiot L.J., Aizpún J.E., Moreno V.J. (2006) Striped weakfish (*Cynoscion guatucupa*): A biomonitor of organochlorine pesticides in estuarine and near-coastal zones. Marine Pollution Bulletin, 52: 74–80.

Lepori V.E.C, Mitre B. G. y Nassetta M. (2013) Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. Rev. Int. Contam. Ambie., 29:25-43.

Luchini L.M. (1988) Producción de “Bagre Negro” o Catfish sudamericano. Revista Argentina de Producción animal. Vol. 8 N° 5: 433-439.

Luchini L.M. (1990) Manual para el cultivo del Bagre Sudamericano (*Rhamdia sapo*), Santiago de Chile: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Oficina Regional para América Latina y el Caribe, FAO 60 pp, RLAC/90/16-PES-20.

Marchioro M.I., Baldisserotto B. (1999) Sobrevivenencia de alevinos de Jundía (*Rhamdia quelen*, Quoy y Gaimard, 1824) a variacao de salinidade da agua. *Ciencia Rural* 29(2): 315-318.

Marcotegui P.S., Martorelli S.R. (2009) *Ligophorus saladensis* n. sp. (Monogenea: Ancyrocephalidae) from *Mugil platanus* Günther in Samborombón Bay, Argentina. *Systematic Parasitology*, 74 (1): 41-47.

Mehler W.T., Schuler L.J., Lydy M.J., (2008) Examining the joint toxicity of chlorpyrifos and atrazine in the aquatic species: *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* and *Chironomus tentans*. *Environmental Pollution*, 152: 217-224.

Miron dos Santos D., Crestani M., Shettringer M.R., Vera V.M., Baldisserotto B., Tierno M.A., Moraes G., Pimentel Vieira V.L. (2005) Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 398-403.

Montagna M., Collins P. (2008) Oxygen consumption and ammonia excretion of the freshwater crab *Trichodactylus borellianus* exposed to chlorpyrifos and endosulfan insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92: 150-155.

Moyle P.B., Cech J.J. (2004) *Fishes: An introduction to Ichthyology*, 5th Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, 726 pp.

Mugni H., Ronco A., Bonetto C. (2011) Insecticide toxicity to *Hyalella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 350-354.

Mugni H., Demetrio P., Paracampo A., Pardi M., Bulus G., Bonetto C. (2012) Toxicity persistence in runoff water and soil in experimental soybean plots following chlorpyrifos application. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 89(1): 208-12.

Piaia R., Townsend C.R., Baldisserotto B. (1999) Growth and survival of fingerlings of silver catfish exposed to different photoperiods. *Aquaculture Internacional*, 7: 201-205.

Ringuelet R.A., Aramburu R.H., De Aramburu A.A. (1967) *Los peces Argentinos de Agua Dulce*, La Plata: Dirección de Impresiones del Estado y Boletín Oficial, 600pp.

Rosso J.J. (2006) *Peces Pampeanos, Guía y Ecología*, 224 pp, Editorial LOLA, Bs. As.

SAGYP (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca) (2013) <http://www.minagri.gob.ar/site/index.php>

SenthilKumar P., Samyappan K., Jayakumar S., Deecaraman M. (2007) Impact of Chlorpyrifos on the Neurosecretory Cells in a Freshwater Field Crab, *Spiralothelphusa hydrodroma*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 3(6): 625-630.

SILFVERGRIP A.M.C. (1996) A systematic revision of the Neotropical catfish sh genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae), Stockholm: Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 156pp.

Sineiro de Sprechmann A. (1978) Comportamiento ambiental parental en *Cichlosoma facetus* (Jenyns) (Pisces, Cichlidae). Revista de Biología del Uruguay, 6: 31-38.

Singh P.B., Singh V. (2008) Pesticide bioaccumulation and plasma sex steroids in fishes during breeding phase from north India. Environmental Toxicology and Pharmacology 25: 342-350.

Sokal R.R., Rohlf F.J. (1995) Biometry, Freeman W.H., Nueva York.

Sotomayor V. (2011) Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la expresión génica de embriones de *Rhinella arenarum*. Mecanismos de acción y vías de señalización. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, Químicas y del Medio Ambiente (LIBIQUIMA), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, tesis doctoral.

Soumis N., Lucotte M., Sampaio D., Cruz Almada D., Giroux D., Morais S., Pichet P. (2003) Presence of organophosphate insecticides in fish of the amazon river. Acta Amazonica, 33: 325-338.

<http://acta.inpa.gov.br/fasciculos/33-2/PDF/v33n2a13.pdf>

Spivak E. (2004) Cangrejos Verdaderos: Braquiuros, La Vida Entre Mareas: vegetales y animales de las costas de Mar del plata, Argentina, INIDEP y Secretaria de Agricultura, Ganadería, pesca y Alimentos, Mar del Plata, 219-228 pp.

Sun F., Wong S.S., Li G.C., Chen S.N. (2006) A preliminary assessment of consumer's exposure to pesticide residues in fisheries products. Chemosphere, 62: 674-680.

Tongbai W., Damrongphol P. (2011) Bioactivation of Chlorpyrifos in the Riceland Prawn, *Macrobrachium lanchesteri*. Journal of Biological Sciences, 11(3): 275-281.

USEPA (2002) Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos
http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/chlorpyrifos_red.pdf

Wang L.G., Jiang X., Mao Y.M., Zhao Z.H., Bian Y.R. (2005) Organophosphorus pesticide extraction and cleanup from soils and measurement using GC-NPD. Pedosphere, 15: 386-394.

Watts M. (2012) Chlorpyrifos as a possible global POP for Pesticide Action Network North America.

http://www.pan-europe.info/News/PR/121009_Chlorpyrifos_as_POP_final.pdf

Xing H., Li S., Wang Z., Gao X., Xu S., Wang X. (2012) Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103: 74–80.

Xu W., Jilong L., Houjuan X., Shiwen X. (2011) Review of Toxicology of Atrazine and Chlorpyrifos on Fish. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 18(4): 88-92.

Zagarese H.E. (1988) Rearing of fry south american catfish (*Rhamdia sapo*) on natural zooplankton populations. *Aquaculture*, 70(4): 323-331.

-CAPÍTULO 7-

UTILIZACIÓN DE LARVAS DE *R. ARENARUM* COMO ORGANISMO BIOINDICADOR DEL ESTADO DE LAS AGUAS DE LA ZONA AGRÍCOLA DE TRES ARROYOS Y CLAROMECÓ A PARTIR DEL USO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

7.1. INTRODUCCIÓN

Se ha informado que en los últimos años las distintas poblaciones de anuros se han visto amenazadas y diezmadas por una variedad de impactos antropogénicos, entre los cuales se encuentra la exposición a pesticidas y fertilizantes (Peltzer *et al.*, 2008; Kerby y Storfer, 2009). Diversos trabajos han verificado el impacto de los sistemas agrícolas sobre la fauna regional de vertebrados, de igual forma que se ha detectado la presencia de residuos de plaguicidas en especies silvestres (Lajmanovich *et al.*, 2005; Peltzer *et al.*, 2013).

Los anfibios que habitan áreas agrícolas están expuestos a numerosos plaguicidas como fosforados, carbamatos y piretroides, entre otros, debido a la dispersión aérea proveniente de las fumigaciones y la escorrentía superficial. Estos productos químicos anticolinesterásicos, pueden tener efectos negativos en las poblaciones de anfibios y convertirse en un factor importante de su disminución en los agroecosistemas (Attademo *et al.*, 2011), como así

también alterar sus ensambles y tener un efecto negativo sobre su ecología reproductiva (Sanchez *et al.*, 2013).

Los anfibios son particularmente vulnerables ya que se reproducen y ponen sus huevos en el agua en épocas de lluvia, que muchas veces coincide con la aplicación de grandes cantidades de estos químicos (Figura 7.1). Su piel es altamente permeable a estas sustancias y la metamorfosis representa un paso crítico durante la etapa larval (Ferrari *et al.*, 2009), que es regulada por vías hormonales, y que puede verse afectada por compuestos exógenos (Figura 7.2). Las alteraciones de los ambientes acuáticos y/o el deterioro en la calidad de los mismos, pueden influir en la capacidad de alimentación y natación de los anfibios (Peltzer *et al.*, 2008); en la duración del hidroperíodo y en el tamaño alcanzado durante la metamorfosis afectando el normal desarrollo y la supervivencia de los huevos y larvas debido a la mortalidad y la depredación (Bionda *et al.*, 2012). Por todas las razones antes mencionadas, sumadas a que poseen una ubicación estratégica en la cadena trófica y capacidades relativamente bajas de dispersión, los anuros son sensibles bioindicadores de los cambios ambientales, y se pueden considerar como una buena medida del estado, calidad o condición tanto de los ecosistemas terrestres como acuáticos (Izaguirre *et al.*, 2006). Los indicadores biológicos o bioindicadores son tasas de organismos que representan las condiciones ambientales a partir de ser indicativos o estar ausentes en sitios impactados, mostrar la acumulación de toxinas que representen los niveles ambientales o alguna otra respuesta medible de estrés, tales como cambios en el comportamiento y/o la fisiología (Niemi *et al.*, 1997).

Los biomarcadores, originalmente desarrollados conceptualmente en la farmacología y toxicología médica, se han convertido en una herramienta útil de los estudios de riesgo ecológico y monitoreo ambientales. Un biomarcador en una muestra biológica manifiesta variaciones medibles inducidas por xenobióticos a nivel celular o bioquímico en componentes, procesos, estructuras o funciones (McCarty *et al.*, 2002). Los mejores biomarcadores son aquellos altamente específicos a un contaminante particular, aunque se han establecido muy pocos que cumplen con esta condición. En general, son relativamente específicos y sensibles, ya que responden a cambios antes que se manifiesten efectos negativos sobre organismos o poblaciones. Los biomarcadores se pueden clasificar de acuerdo a los parámetros que se determinan, como de exposición, de efecto o de susceptibilidad. Los biomarcadores de exposición son aquellos que determinan la presencia de ciertos contaminantes o sus

metabolitos, sin que sus valores alterados conlleven a un perjuicio significativo del desempeño del animal en cualquiera de sus actividades. Mientras que un biomarcador de efecto no solo indica la presencia de contaminantes en el ambiente, sino que su alteración se encuentra asociada a un perjuicio significativo en una o más funciones que comprometan el rendimiento del animal (Adams, 2001; Rodriguez, 2006).

En el caso particular de los compuestos organofosforados (OFs), existe numerosa evidencia que demuestra que pueden actuar sobre el sistema de defensa del organismo, que al verse superado termina generando alteraciones en el desarrollo (Colombo *et al.*, 2005; Lascano *et al.*, 2009; Lascano *et al.*, 2011; Sotomayor *et al.*, 2012) o los hace más susceptibles a ciertas enfermedades (Kerby y Storfer, 2009). Un ejemplo de ello son los resultados obtenidos por Colombo *et al.* (2005) en la especie *Xenopus laevis*, en los que se observa una relación directa entre la actividad de la AChE (Acetilcolinesterasa) y la cantidad de clorpirifos aplicada experimentalmente. Además observaron severos daños histopatológicos en las células musculares de la cola y en las células que recubren la notocorda, de la cual no se tenía evidencia en vertebrados no mamíferos.



Figura 7.1. Amplexo en el agua de *Rhinella arenarum*

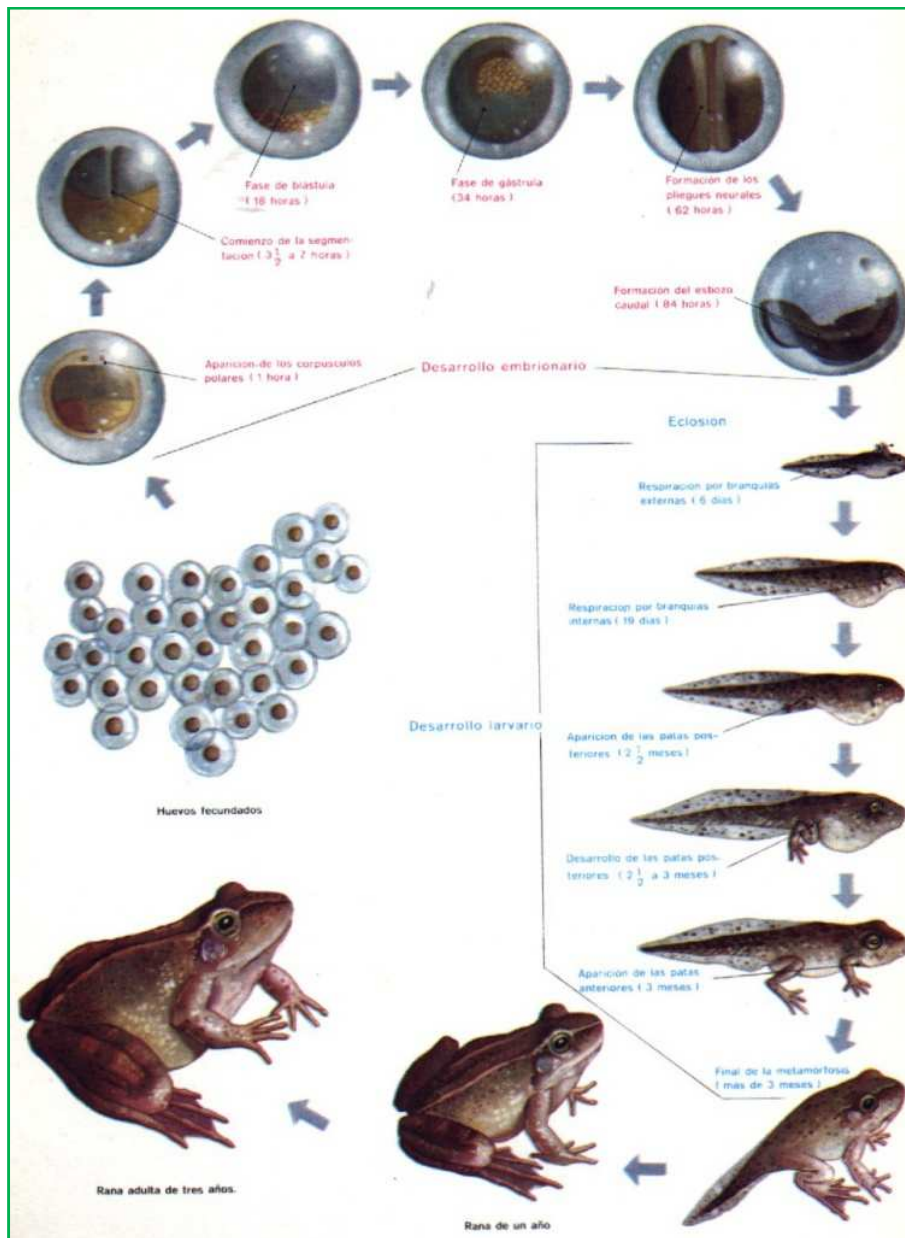


Figura 7.2. Metamorfosis de los anuros. Las 3 fases esenciales del desarrollo son: huevo, embrión y larva. Los procesos que dan origen o señalan el comienzo de la fase siguiente son: fecundación, eclosión y metamorfosis. Cada una de estas fases comprende un gran número de etapas (25 estadios).

7.1.1. Metabolización de los organofosforados y modo de acción

Los organofosforados contienen un átomo central de fósforo con un doble enlace a un átomo de oxígeno o azufre, dos grupos alquílicos (R1 y R2) que contienen grupos etilos, metilos o isopropilos, y un grupo saliente que es específico de cada OF, y que le da variaciones en sus propiedades físico-químicas (Figura 7.3).

Además de los gases nerviosos, sólo unos pocos compuestos OFs son de la forma oxón $P=O$ (por ejemplo: diclorvos). La mayoría, denominados fosforotioatos, presentan el enlace $P=S$ y necesitan ser activados a su correspondiente análogo oxigenado para manifestar neurotoxicidad. La activación ocurre a través de un proceso de desulfuración oxidativa mediado por el sistema enzimático de las monooxigenasas de función mixta microsomales: citocromo P450 y FMO (monooxigenasas que contienen flavina), que dependen de la concentración de NADH y utilizan oxígeno molecular. Los OFs del tipo fosforotioatos ($P=S$) poseen mínima o nula actividad anticolinesterásica (Jokanovic, 2001).

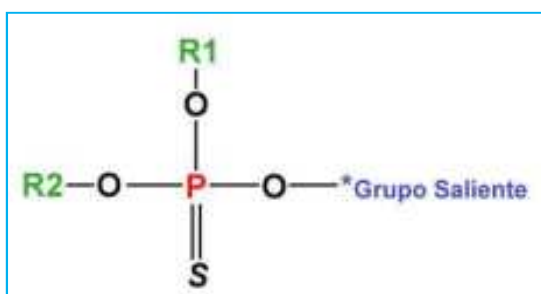


Figura 7.3. Estructura general de los plaguicidas OFs. El doble enlace se da entre el átomo de fósforo central y un oxígeno o azufre. El grupo saliente es específico de cada OFs.

Una vez ingresado el tóxico en los sistemas animales, los procesos de biotransformación provocan una serie de transformaciones químicas catalizadas por enzimas que introducen grupos polares en partes de la molécula de menor polaridad, para que estas puedan ser excretadas por orina. El hígado es el órgano con más capacidad para la biotransformación. Este proceso ocurre en dos etapas. En la primera etapa (Fase I) se verifican las reacciones que

convierten grupos funcionales determinados en otros nuevos, y son reacciones de oxidoreducción e hidrólisis (Albendín García, 2009; Jokanovic', 2001; Sotomayor, 2011). En la segunda etapa (etapa o Fase II) se verifican las reacciones denominadas de conjugación y son de tipo sintético, en las cuáles los productos de la fase I son conjugados con ácido glucurónico, glutatión, sulfatos, acetatos y aminoácidos (Albendín García, 2009; Jokanovic', 2001). En estas reacciones, el organismo se vale de un grupo de enzimas distintas de las que intervienen en la Fase I. Es importante la existencia de estas dos etapas, ya que no siempre la biotransformación que ocurre en la etapa I, resulta en la pérdida de la actividad biológica indeseable para el organismo o en la suficiente hidrosolubilidad que permite la rápida excreción (Castro y Castro com. per., 2008). Algunos ejemplos de enzimas involucradas en las reacciones de la etapa II son: las enzimas citosólicas GST (Glutatión S- transferasa) que adicionan glutatión (GSH), las enzimas UDP glucuronil-transferasas, las sulfotransferasas, entre otras (Sotomayor, 2011).

Los compuestos organofosforados como el clorpirifos pueden sufrir dos tipos de reacciones de fase 1: hidrólisis/dearilación y desulfuración/oxidación. En el primer caso, los productos generados no son tóxicos, mientras que en el segundo la formación de oxifosfatos incrementa la toxicidad. Las principales enzimas involucradas en la desulfuración de clorpirifós, metilazinfos y otros OFs son CYP1A2, -2B6 y -3A4 (Jokanovic', 2001; Lascano, 2012).

El grupo saliente que es específico de cada OFs es hidrolizado por la enzima AChE en el proceso de inactivación de la misma. La inhibición de AChE, esterasa de tipo B, por insecticidas OFs es análoga al proceso de hidrólisis de su sustrato natural Acetilcolina (ACh), en la cual el hidroxilo de un residuo de serina en el sitio activo de la enzima es fosforilado y se libera el grupo saliente del OFs. Por dicha razón, se dice que la AChE es el blanco primario de acción de los insecticidas organofosforados. Esta enzima se encuentra principalmente en el sistema nervioso central y periférico de mamíferos, aves, reptiles, peces e insectos, y desempeña un papel muy importante en la neurotransmisión colinérgica al hidrolizar el neurotransmisor ACh liberando ácido acético y colina (Fukuto, 1990). Con la acetilcolina el complejo enzima-sustrato se descompone dejando la enzima acetilada, que luego se regenera rápidamente por hidrólisis. En cambio, por fosforilación de los OFs se forma un complejo enzima-inhibidor que bloquea a la AChE y produce su envejecimiento (Lascano, 2012), en el

cuál el único modo de recuperación de la actividad de AChE es por la síntesis de *novo* de la proteína catalítica, lo que implica un mecanismo a largo plazo (Sotomayor, 2012) (Figura 7.4). Existen otras B esterases que también hidrolizan ésteres con radicales alquílicos y son inhibidas por compuestos como los organofosforados o los carbamatos, como la butirilcolinesterasa (BChE), la carboxilesterasa (CE) y la esterase neurotóxica (NTE) (Albendín García, 2009). La CE reduce los montos de estos insecticidas que podrían alcanzar al sitio activo de la AChE inactivándola (Ferrari *et al.*, 2007).

La inhibición produce la acumulación del neurotransmisor acetilcolina, y por lo tanto los signos de la intoxicación se corresponden con una estimulación excesiva de los nervios colinérgicos cuyos síntomas incluyen tensión, ansiedad, ataxia, convulsiones, coma y depresión de los centros respiratorio y circulatorio. La causa de la muerte usualmente es la falla respiratoria debida a la parálisis neuromuscular, depresión central y broncoconstricción. La toxicidad en general se hace aparente con alrededor de un 50% de inhibición enzimática y la muerte deviene con una inhibición del 80-90% (Castro y Castro com. per., 2008).

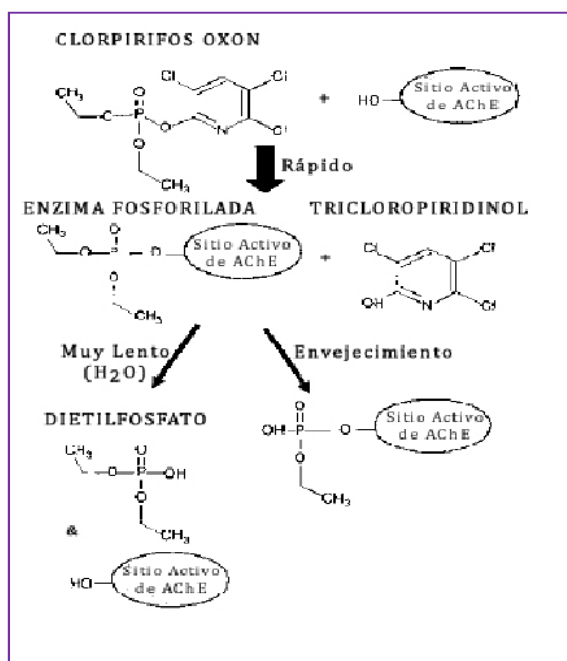


Figura 7.4. Representación esquemática de la interacción del clorpirifos oxón con la AChE (Gupta, 2006).

Además de su acción anticolinesterásica, los plaguicidas OFs son capaces de inducir estrés oxidativo y/o alterar la respuesta antioxidante de diferentes especies acuáticas como *R. arenarum* (Lascano *et al.*, 2009).

El sistema antioxidante tiene un rol preponderante en la regulación de los radicales libres y los niveles de peróxidos que son especies reactivas de oxígeno (EROs). Durante el desarrollo embrionario de *R. arenarum* se ha observado que el sistema antioxidante mejora su eficiencia como una respuesta adaptativa a los incrementos de oxígeno al pasar del agua a la tierra (Ferrari *et al.*, 2008; 2009). Estos agentes se dividen en dos grupos: enzimáticos y no enzimáticos. El GSH (γ -glutamil-cisteína-glicina) es un antioxidante no enzimático que se encuentra presente en la mayoría de las células en altas concentraciones, y participa de diversas reacciones metabólicas así como en la protección celular contra el daño provocado por los radicales libres. Otros agentes antioxidantes presentes en la célula son la vitamina C y E, el ácido ascórbico, los tioles no proteicos, los β -carotenos, la bilirrubina, entre otros (Ferrari *et al.*, 2007; Sotomayor, 2011).

Entre los antioxidantes enzimáticos podemos mencionar:

- Glutation S-transferasas (GST): son enzimas de fase II involucradas en la biotransformación y detoxificación de xenobióticos y de sustancias endógenas, que conjugan a los mismos con el GSH y son inducidas por muchos insecticidas anticolinesterásicos así como también por otros plaguicidas. El efecto de esta reacción es convertir una molécula lipofílica reactiva en una soluble en agua mediante la formación de un conjugado no reactivo que puede ser excretado fácilmente (Anguiano *et al.*, 2001; Ferrari *et al.*, 2007; Sotomayor, 2011).
- Catalasa: es una enzima citoplasmática que cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O y O_2 , previniendo así la acumulación de peróxido de hidrógeno y las consecuencias tóxicas que provocarían la reacción del mismo con los componentes celulares (Lascano, 2012; Sotomayor, 2011). Es considerada la primera línea de defensa antioxidante.

Los agentes oxidantes que generan un incremento de EROs intracelulares son también capaces de activar vías de transducción de señales actuando como segundos mensajeros. La transcripción del gen que codifica a la GST, entre otras enzimas, ocurre por acción del factor de transcripción del heterodímero c-Jun/Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor) a través de su unión al elemento de respuesta antioxidante (ARE: Antioxidant Response Element), presente en la región promotora de este gen. Situaciones tales como estrés oxidativo y/o la alteración del estado redox celular llevan a la liberación del factor de transcripción Nrf2 de su proteína inhibidora (I-Nrf2) y su posterior fosforilación y translocación al núcleo, con la consecuente transcripción de genes que codifican para las enzimas del sistema de defensa antioxidante (Fainstein, 2007; Lascano, 2009; Sotomayor, 2011; Lascano, 2012).

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Estudios a campo

7.2.1.1. Muestras de agua

Se tomaron muestras de agua el día 8/10/11 en el Arroyo Claromecó, a la altura de la cascada 2 y el día 28/11/11 en el Arroyo 3 de Tres Arroyos y el Arroyo Claromecó, al inicio y a la altura de la cascada 2. Se eligieron estos arroyos únicamente debido a que, en el mes de diciembre, han mostrado las mayores concentraciones de clorpirifos en agua en campañas anteriores.

Al agua muestreada se le realizó un análisis fisicoquímico *in situ* y se reservó un litro de muestra por arroyo, por duplicado, para el análisis posterior de clorpirifos y los bioensayos con *Rhinella arenarum* Hensel.

7.2.2. Estudios en el laboratorio

7.2.2.1. Análisis químico de agua y cuantificación de pesticidas

De acuerdo a la información provista por cinco asesores agropecuarios de la zona de estudio, los insecticidas más utilizados son: el clorpirifos (fosforado), la cipermetrina (piretroide), el dimetoato (fosforado), la lambdacialotrina (piretroide), el metoxifenocide (diacilhidracina) y el rynaxypyr (diamida antranílica). Los últimos dos compuestos mencionados, son relativamente nuevos en el mercado y pertenecen al grupo denominado “línea verde”.

Dentro del grupo de los herbicidas podemos mencionar que se utilizan el glifosato, el 2,4-D (éster butílico) y el dicamba (sal dimetilamina del ácido 2-metoxi 3,6 diclorobenzoico).

En todas las muestras de agua se analizó la presencia de clorpirifos, cipermetrina y endosulfán por duplicado. Tanto la extracción como la cuantificación de los pesticidas analizados se realizaron siguiendo los protocolos descriptos en 2.2.5 y 5.2.2.1.

7.2.3. Material Biológico

7.2.3.1. Antecedentes de clorpirifos en la zona de estudio

Durante el año 2011 se colectaron en el arroyo 2 de tres Arroyos renacuajos en estado avanzado de desarrollo que presentaban cola y patas traseras. De estos ejemplares se tomaron cuatro al azar y se analizaron siguiendo el protocolo mencionado en el capítulo 6.2.2 para análisis de clorpirifos. El 50% de los mismos mostraron concentraciones detectables de este insecticida con una concentración media de 0,08 µg/l.

7.2.3.2. Obtención de embriones, inducción de las ovulaciones y fertilización

Las hembras y machos adultos de sapo de la especie *Rhinella arenarum* Hensel fueron recolectados en la localidad de Chascomús, ubicado a 120 km de la ciudad de Bs. As., en una zona de referencia libre de aplicación de plaguicidas.

Los bioensayos se realizaron en el laboratorio de Bioquímica del Instituto de Biotecnología Agropecuaria del Comahue (IBAC), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, provincia de Río Negro.

Se realizaron dos experimentos independientes para cada parámetro a analizar, utilizando parejas distintas de sapos adultos. Las hembras fueron aclimatadas durante 24 hs a 20-23°C. Su ovulación se indujo por inyección intraperitoneal de 2500 UI de glándula hipofisaria homóloga humana. Alrededor de 12 horas después de la inyección y cuando en la cloaca de las hembras era evidente la presencia de ovocitos (Figura 7.5 A), las mismas fueron desmeduladas. Se procedió a la extracción quirúrgica de los ovocitos desde sus ovisacos (Figura 7.5 B). La fertilización *in vitro* de los ovocitos fue realizada pincelando a los mismos con un macerado de testículos de macho. Los ovocitos y renacuajos se mantuvieron en todo momento en solución Ringer (65 g/l NaCl, 1 g/l KCl y 2 g/l CaCl₂) en relación 1 embrión/ml de solución. Los embriones fueron alimentados con lechuga hervida y mantenidos en un régimen de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad a temperatura ambiente durante toda la experiencia (Figura 7.6).

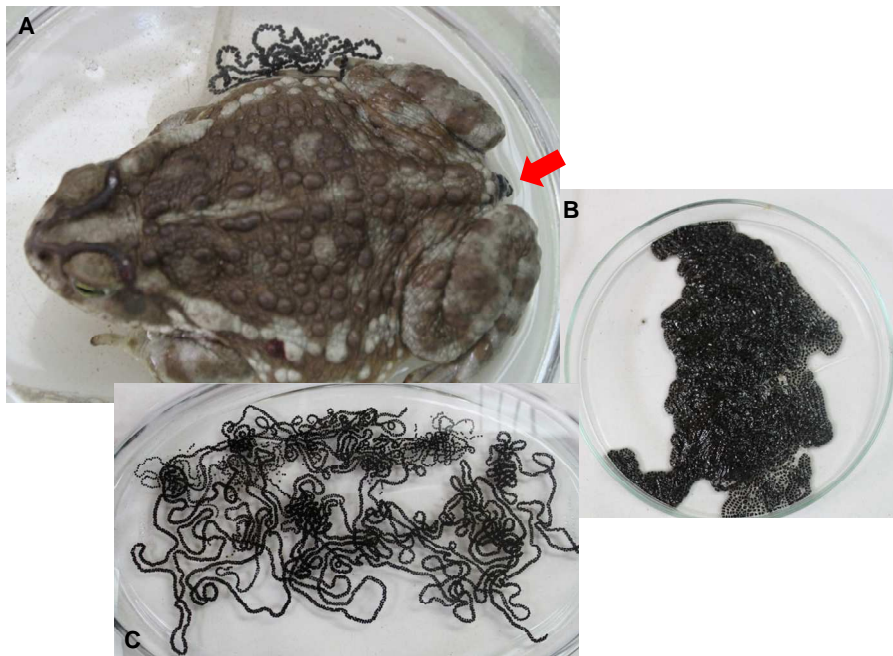


Figura 7.5: Ovocitos y embriones de *Rhinella arenarum*. A) Hembra a punto de poner sus huevos. La flecha roja señala la presencia de ovocitos en su cloaca. B) Ovocitos extraídos de la hembra en A). C) Ovocitos ya fertilizados. *Fotos: Cecilia Lascano*



Figura 7.6. Se observan los renacuajos de ambas ovulaciones mantenidos a temperatura ambiente con solución Ringer.

7.2.3.3. Exposición de *Rhinella arenarum* al agua muestreada

Para los estudios se utilizaron especímenes en el estadio de opérculo completo (OC) (etapa n° 25, Del Conte y Sirling, 1952), una vez alcanzada la etapa larval, a 20 días de desarrollo. Grupos de 200 larvas fueron transferidas a contenedores de vidrio, mediante pipetas Pasteur de plástico, conteniendo una relación de 1 ml/larva de muestra, previamente filtrada para eliminar el material en suspensión. Se realizaron exposiciones por duplicado en un medio control de solución Ringer para anfibio, y de cada una de las muestras de agua. Los estudios se replicaron en dos camadas provenientes de la fertilización in vitro de sendas ovulaciones de distintas hembras (Figura 7.7). Se utilizó un esquema estático de exposición hasta las 96 hs. Las larvas fueron alimentadas durante los ensayos con lechuga hervida, para evitar la pérdida de especímenes debido al canibalismo entre ellos.

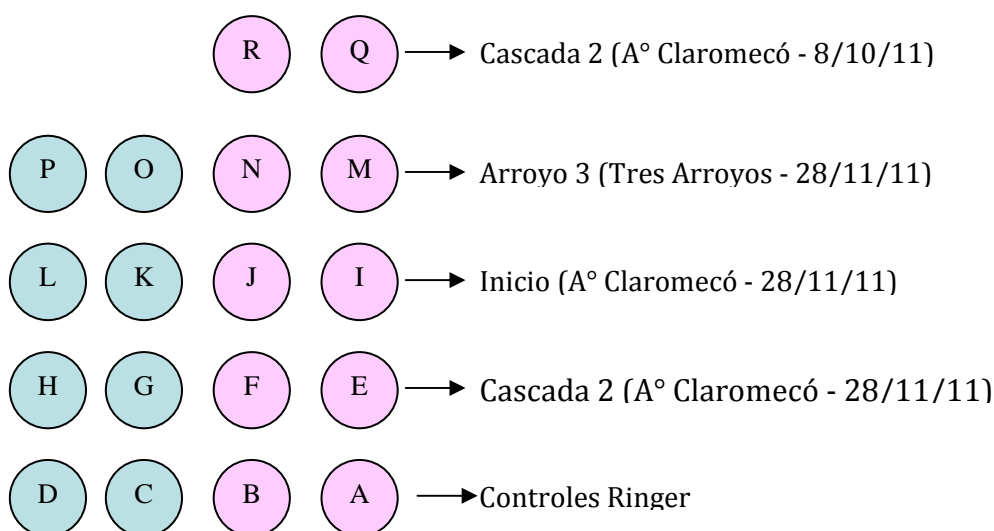


Figura 7.7. Esquema de los tratamientos realizados. Las muestras de diferente color muestran las ovulaciones de hembras distintas. Cada hilera horizontal corresponde al agua del mismo sitio de muestreo (cascada 2 e Inicio del A° Claromecó y Arroyo 3 de la localidad de Tres Arroyos). Entre paréntesis se observa la fecha de muestreo.

7.2.4. Material químico

El 5,5-dithio-2-bis-nitrobenzoate (DTNB), el glutatión reducido (GSH), la albúmina sérica bovina (BSA), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), la glutatión reductasa (GR, lote 78H74301, 173 U/mg), el ioduro de acetiltiocolina, el β -NADPH, la putrescina dihidrocloruro, la espermidina trihidrocloruro y la espermina tetrahidrocloruro fueron comprados a Sigma Co. (St. Louis, MO, USA). El glutatión oxidado (GSSG) fue comprado a ICN Biomedicals Inc (Aurora, OH, USA). La azida sódica fue comprada a Mallickrodt (Phillipsburg, NJ, USA). La L- ^{14}C -ornitina fue comprada a New England Nuclear. El líquido de centelleo Optiphase "Hisafe" 3 fue comprado a Perkin Elmer (Shelton, CT, USA). Todos los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico.

7.2.5. Determinaciones bioquímicas

Los ensayos se comenzaron el día 1 de Diciembre de 2011, por la tarde, en la Universidad Nacional del Comahue, provincia de Neuquén. Todas las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800.

Cada muestra consistió en un total de 50 embriones previamente lavados en solución Ringer fría, a los que se le procedió a realizar un homogenato con 2 ml de buffer fosfato de potasio 143 mM pH 7,5 con 6,3 mM EDTA- Na_2 (buffer PiK - pH= 7,5) colocados brevemente en hielo hasta ser procesados. Los ensayos se realizaron a las 24, 48 y 96 hs de exposición. De los 2,5 ml del homogenato (2 ml de Buffer PIK + 0,5 ml de renacuajos) realizado en cada caso, se separaron 600 μl para el ensayo de GSH (glutatión reducido), 250 μl para TBARs y el resto se centrifugó a 10.000 xg por 30 min a 4 °C. De esta centrifugación se separó el sobrenadante para el análisis de Carboxilesterasas (CE), Acetil-colinesterasas (AChE) y Glutation-S-Transferasa (GST). También se calcularon proteínas totales a partir del precipitado obtenido de la estimación de GSH.

La cuantificación de GSH y TBARs se realizaron al momento de preparado el homogenato y el resto de los ensayos se realizaron al final de las 96 hs en los sobrenadantes conservados a -20°C.

7.2.5.1. Concentración de proteínas totales

El contenido proteico de las muestras se determinó de acuerdo con la técnica de Lowry *et al.* (1951), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

El precipitado separado en la medición de GSH se lava con acetona, resuspendiendo el pellet. Se centrifuga a 10.000xg durante 10' a 4 °C y se descarta el sobrenadante (acetona). Este paso se repite dos veces más. Luego se digiere el pellet con 600 µl de NaOH 1 N para desnaturalizar las proteínas y resuspender el pellet nuevamente. Se toman 5 µl de la muestra, por duplicado, y se le agregan 195 µl de NaOH 0,1 N (Vf: 200 ml). Se le agrega 1 ml de carbonato de Na al 2% en agua destilada + 0,1 ml de tartrato de potasio + 0,1 ml de sulfato de cobre y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente. A cada muestra se le agrega 0,1 ml de reactivo de Folin (en agitación en vortex) diluido a la mitad y se deja reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se mide la coloración azul a 750 nm en cubeta plástica.

Para esta técnica se realiza una curva de calibración ($Y = 0,0099x + 0,0109$; $R^2 = 0,99$) con los valores de absorbancia (eje x) medidos para cada valor standard de albúmina sérica bovina (BSA) (eje y), obtenidos de mezclas crecientes de BSA (1 mg/ml) con NaOH 0,1 N (µl) en un volumen final de 200 µl.

7.2.5.2. Actividad de la colinesterasa (AChE)

La actividad de colinesterasa (ChE) fue determinada de acuerdo con el método de Ellmann *et al.* (1961). Las muestras fueron guardadas en 1 ml de buffer fosfato de sodio 100 mM, pH=8, a -20 °C hasta su procesamiento, homogeneizadas y centrifugadas a 10.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue utilizado inmediatamente para la determinación enzimática. La reacción se desarrolló en 1 ml de volumen total en la cubeta, que contenía: 860 µl de buffer fosfato de sodio (100 mM, pH= 8,0), 20 µl Ditio bis nitrobenzoato (DTNB) 10 mM, 20 µl de ioduro de acetiltiocolina como sustrato (0,75 mM) y 100 µl de muestra. La actividad de AChE se monitoreó a 412 nm durante un minuto y la actividad específica se expresó como mUI mg proteína⁻¹, dónde UI es umol/min, utilizando un

coeficiente de extinción molar de $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A cada valor de Absorbancia medido se le resta el valor de la línea de base de la reacción química en ausencia de muestra y los cálculos se realizan con la Absorbancia neta.

$$AE \text{ AChE } (\mu\text{mol/min/mg proteína}) = \frac{(\Delta\text{abs}_{412\text{nm}})/\text{min} \times VT \text{ (ml)} \times \text{dil}}{13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times V_{\text{enz}} \text{ (ml)} \times [\text{proteína}] \text{ (mg/ml)}}$$

La enzima AChE cataliza la hidrólisis del sustrato, Acetiltiocolina Ioduro, para producir tiocolina y acetato. La tiocolina a su vez, reduce el DTNB a TNB (5-tio-2-nitrobenzoato), el cual absorbe a una longitud de onda de 412 nm. Si bien la enzima medida es mayormente AChE, al no haber utilizado ningún inhibidor selectivo de la BChE, las actividades medidas pueden ser consideradas de colinesterasas en general.

7.2.5.3. Carboxilesterasas (Aliesterasas)

La actividad de las carboxilesterasas (cerebrales y hepáticas) se realizaron siguiendo la técnica de Caballero *et al.* (1992) con algunas modificaciones. Se utilizó como sustrato p-nitrofenilbutirato (PNPB). Este funciona como sustrato de la enzima y da como producto p-nitrofenol. La Actividad específica se expresó en umoles de p-nitrofenol producidos/ (min*mg proteína)⁻¹. El volumen total utilizado en la cubeta fue de 1 ml: 10 ul PNPB (1mM) en acetona, 890 ul Buffer fosfato de sodio (100 mM a pH=8) y 100 ul muestra. Previamente se calcula la línea de base con el buffer fosfato y PNPB sin la muestra, y con este valor se corrigen las absorbancias medidas a 400 nm con lámpara visible. La actividad se mide por un minuto y se utiliza el coeficiente de extinción molar de $18,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

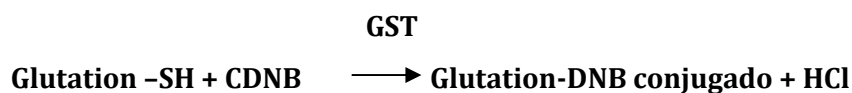
$$AE_{CE} (\mu\text{mol/min/mg proteína}) = \frac{(\Delta\text{abs}_{400\text{nm}}) \text{ /min} \times VT \text{ (ml)} \times \text{dil}}{18,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times V_{\text{enz}} \text{ (ml)} \times [\text{proteína}] \text{ (mg/ml)}}$$

7.2.5.4. Glutación S-transferasa (GSH S-aril transferasa)

La actividad de GST fue ensayada mediante el método de Habig *et al.* (1974) con algunas modificaciones. Se utilizó 10 μ l de CDNB (50 mM disuelto en 10,1 mg/l de acetonitrilo) y 50 μ l GSH (50 mM) como sustratos, en un volumen final de 1 ml con buffer fosfato de 100 mM a pH=6,5.

Se inició la reacción con el agregado de 50 μ l de muestra y se leyó la absorbancia de manera continua a 340 nm con cubeta de cuarzo durante 2 minutos.

La reacción enzimática se produce debido a que el GST de la muestra utiliza al GSH y al CDNB dando un nuevo producto coloreado:



Los valores de actividad fueron corregidos por la línea de base obtenida de la absorbancia de los reactivos sin muestra y la actividad fue calculada como μ moles de CDNB conjugado fueron calculados utilizando un coeficiente de extinción molar de $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

$$\text{AE GST } (\mu\text{mol/min/mg proteína}) = \frac{(\Delta\text{abs}_{340 \text{ nm}})/\text{min} \times \text{VT (ml)} \times \text{dil}}{9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times V_{\text{enz}} \text{ (ml)} \times [\text{proteína}] \text{ (mg/ml)}}$$

7.2.5.5. Contenido de glutatión reducido (Tioles de ácido solubles) mediante el método de Ellman (modificado) *Ellman, G.L (1959). Arch. Biochem. Biophys 82:70; Venturino A. y col. 2001*

El fundamento de la técnica se basa en la reacción del grupo reducido de SH en el GSH, con el reactivo de sulfhidrilos ditio-bis-nitrobenzoato (DTNB). El producto TNB por ruptura del puente s-s en el DTNB se detecta con un máximo de absorbancia a 412 nm.

Los reactivos que se utilizan son: ácido tricloroacético (TCA) al 5 % y al 10% en agua destilada, Buffer fosfato de potasio (PIK) 0,25 M a pH=8, DTNB (reactivo de Ellmanm se debe de mantener protegido de la luz) 1,5 mM en buffer PIK 0,25 M a pH=8, solución madre GSH de 10 mM en agua destilada, solución Standard GSH 0,1 mM en TCA al 5% (se diluye en el momento con 10 µl de GSH madre en 990 µl de TCA al 5%).

Para la determinación del contenido de GSH, se tomaron 600 µl del homogenato y se le agregaron 200 µl de TCA al 10%, para precipitar las proteínas. Se centrifugaron a 20.000 xg por 15 minutos a 4 °C. El precipitado se guardó en heladera para la posterior medición de proteínas totales.

Luego se tomaron 200 µl del sobrenadante y se le agregó 1 ml del DTNB a todas las muestras.

A las 24, 48 y 96 hs se armó una curva de calibración que consistió en preparar soluciones crecientes de GSH 0,1 mM con TCA 5 % en un volumen final de 200 µl. A todos los eppendorfs se les agregó 1 ml del DTNB y se leyó en el espectofotómetro.

En la curva de calibración se grafican las absorbancias netas obtenidas de la resta de cada valor con la absorbancia resultante de 200 µl de TCA 5% y 0 nmoles de GSH. Luego con la ecuación obtenida de dicha curva se obtienen los mmoles de GSH, que al dividir por 0,2 ml dan los valores finales de mmoles de GSH/ml.

7.2.5.6. Peróxidos lipídicos por Malondialdehído (MDA). Método del ácido Tiobarbitúrico (TBA) Asakawa T. and Matsushita S. (1980)

El fundamento de la técnica se basa en la formación de MDA a partir de peróxidos preformados, por la reacción en cadena de Fenton al agregar sulfato ferroso. El TBA da el color al reaccionar con el MDA. Se produce en medio ácido gracias al agregado de ácido tricloroacético (TCA) y se adiciona BHT, agente antioxidante, para que la reacción no continúe más allá de lo que nos interesa observar.

Los reactivos que se utilizan en esta técnica son: ácido tiobarbitúrico al 0,72 % (0,36 g de TBA en 50 ml de agua destilada, se calienta hasta disolver), sulfato ferroso heptahidratado 2,78 % (0,139 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 5 ml de agua destilada, que se prepara en el momento), Hidroxitolueno Butilado (BHT) 0,22% en etanol (se prepara en el momento), ácido tricloroacético 25% (se pesan 25 g y se disuelve en 100 ml de agua destilada), estándares de MDA que se preparan a partir de 1,1,3,3 tetrametoxi propano (TMP) como generador de MDA.

Para los estándares se prepara por un lado la solución madre de 8,3 µl de TMP puro en 491,7 µl de TCA 25% y por el otro la dilución de trabajo que consta de 5 µl de madre de TMP diluidos en 4,99 ml de agua destilada que se preparan cada vez que se va a medir.

Se prepara la curva estándar para la medición de Malondialdehído, a partir de la coloración por la reacción con el ácido tiobarbitúrico, con concentraciones crecientes de TMP (0,1 µmol/ml) en agua destilada, hasta un volumen final de 250 µl para cada tiempo ensayado. A partir de la curva obtenida se conocen los nmoles de MDA.

Se toman 250 µl del homogenato de cada muestra y se coloca en tubos de ensayo. Luego se le agrega a cada uno 250 µl de TBA al 0,72%, 250 µl de TCA al 25%, 25 µl de sulfato ferroso heptahidratado al 2,78% y 25 µl de BHT 0,22% en etanol.

Se colocan todos los tubos en baño maría a 100 °C durante 15'. Se deja enfriar y se agregan 250 µl de ácido acético glacial y 500 µl de cloroformo, luego se transfieren a los tubos y se centrifugan durante 15' a la máxima velocidad posible.

Se toma la fase orgánica superior de coloración rosada con pipeta pasteur y se dispone en cubeta de vidrio para la medición. Se leen todas las muestras a 532 nm y a 600 nm incluido los estándares, debido a que el MDA no absorbe a 600 nm y de esa forma se puede corregir

cada valor eliminando el ruido por turbidez. Los moles de TBARS de las muestras se calculan a partir del valor de absorbancia corregida a 532 nm.

Para el valor de absorbancia corregida se deben de realizar una serie de pasos adicionales. Para ello se grafican los valores de absorbancia de MDA para las longitudes de onda de 600, 650 y 700. Con la ecuación de la recta del gráfico ($-0,000078x+0,0762$; $R=0,99$) se obtiene el valor de absorbancia a 532 nm. Luego se calcula un factor mediante la siguiente fórmula: $\text{Factor} = \text{Abs}_{532}/\text{Abs}_{600} = (0,0347/0,0295) = 1,1753$. Este factor se multiplica por todos los valores obtenidos de absorbancia a 600 nm y luego se restan con los valores de absorbancia medidos a 532 nm. Así finalmente se obtienen los valores a 532 nm corregidos habiendo eliminado el ruido por turbidez.

Una vez realizado el paso de corrección de absorbancia se calculan los nmol peróxidos con las curvas de calibración para cada tiempo.

7.2.5.7. Actividad específica de la Catalasa

La actividad específica de la Catalasa fue determinada monitoreando el decrecimiento constante de la absorbancia a 240 nm de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (modificado de Beers and Sizer y Regoli)

La catalasa cataliza la siguiente reacción:



Nuestra muestra aporta la catalasa que actúa en dicha reacción consumiendo H_2O_2 . La mezcla de reacción para la medición de la enzima contenía 1 ml de volumen total, 980 μl de buffer fosfato 50 mM (pH 7,0) y H_2O_2 25 mM, más 20 μl de muestra. Para la medición en el espectofotómetro se utilizó una cubeta de cuarzo y se corroboró previamente que la absorbancia del buffer y el sustrato estuviesen en 1 unidad de absorbancia. La reacción catalítica comienza cuando se le agregan a los 980 μl del sustrato en buffer y los 20 μl de la muestra; se cubre a la cubeta de cuarzo con polietileno, se mezcla suavemente y se mide.

La actividad específica fue expresada como mmol de H₂O₂ hidrolizada por minuto por mg de proteína usando el coeficiente de extinción molar de 40 M⁻¹ cm⁻¹.

$$AE\ CAT\ (mmol/min/mg\ proteína) = \frac{(\Delta abs_{240nm})/min \times VT\ (ml) \times dil}{40\ mM^{-1}\ cm^{-1} \times V_{enz}\ (ml) \times [proteína]\ (mg/ml)}$$

7.2.6. Análisis de datos y estadística

Para el análisis de las actividades específicas de las enzimas testeadas para cada tratamiento (ovulaciones de sapos hembra distintas) y a cada tiempo (24, 48 y 96 hs) se calcularon las medias y desviaciones estándar (*Media ± SD*) como el promedio de dos determinaciones.

Las diferencias estadísticas entre tiempos y tratamientos fueron determinadas por ANOVA y el test post hoc de Fisher de mínimas diferencias significativas (LSD).

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. Pesticidas detectados en el agua

En las muestras de agua analizadas solo se detectó clorpirifos. En la Tabla 7.1 se observan las concentraciones de clorpirifos registradas en las aguas de Tres Arroyos y Claromecó para los sitios elegidos de muestreo.

Tabla 7.1. Concentración media de clorpirifos en las muestras de agua (n=2) analizadas de los meses de octubre y noviembre de 2011 de Tres Arroyos y Claromecó para el análisis de biomarcadores.

Sitio de muestreo	Fecha	Concentración de clorpirifos ($\mu\text{g/l}$) \pm SD
Claromecó (altura Cascada 2- C ₂ Cl _o)	18/10/11	0,060 \pm 0,009
Claromecó (altura Cascada 2- C ₂ Cl _n)	28/11/11	0,0021 \pm 0,0002
Claromecó (inicio -ICl _n)	28/11/11	0,160 \pm 0,019
Tres Arroyos (Arroyo 3 - A ₃ TA _n)	26/11/11	0,008 1 \pm 0,0004

7.3.2. Efectos de las aguas sobre el sistema de defensa antioxidante

Se determinaron las actividades específicas de GST y catalasa, los niveles endógenos de GSH y la formación de peróxidos a las 24, 48 y 96 hs de exposición al agua de los arroyos de Tres Arroyos y Claromecó.

7.3.2.1. Actividad de la catalasa

Para la actividad de la catalasa se observaron diferencias significativas entre días y entre las diferentes muestras de agua ($p < 0,05$) (Figura 7.8). El ANOVA indicó una interacción entre los factores de Tratamiento (Agua) y Día ($p = 0,0006$), por lo que se analizaron diferencias entre los tratamientos dentro de cada día de exposición.

En el día 1 solo dos de las muestras de agua mostraron diferencias significativas en larvas expuestas respecto del control que mostró una actividad de 43,22 UI/mg proteína. Estas muestras son las correspondientes a la cascada 2 del arroyo Claromecó de los meses de octubre (C₂Cl_ot), en la cual se observó en larvas un 30% menos de actividad que el control, y de noviembre (C₂Cl_nov) cuya actividad fue de un 14% mayor ($p < 0,05$).

La muestra C₂Cloct ocasionó en larvas el valor más bajo (30,14 UI/mg proteína) y su diferencia fue significativa con el resto de las muestras en todos los casos. La muestra C₂Clnov generó en las larvas el valor de actividad más alto (49,52 UI/mg proteína) que difirió significativamente del control, como se mencionó anteriormente. Esta actividad no mostró diferencias significativas con el valor obtenido en larvas expuestas al agua del Arroyo 3 (A₃TA_n) de Tres Arroyos cuyo valor fue de 44,40 UI/mg proteína ($p < 0,05$). En estas dos últimas muestras la diferencia de actividad fue de un 10%.

En el día 2 todas las muestras fueron significativamente más altas que el control (ANOVA, $p < 0,000001$). El control mostró una actividad de 43,17 UI/mg proteína, mientras que la actividad de la catalasa fue de 68,20 UI/mg proteína (58% más que el control) en C₂Cl_o, de 88,20 UI/mg proteína (104% más que el control) en C₂Cl_n, de 84,46 UI/mg proteína (95% más que el control) en A₃TA_n y de 87,45 UI/mg proteína (102% más que el control) en ICl_n. ($p < 0,05$). Como puede observarse la muestra C₂Cl_o aumentó un 58% la actividad de CAT de larvas a las 48 horas, pero en promedio se mantuvo en un 27% menos que el resto de las muestras de noviembre ($p < 0,01$).

En el día 4 todos los valores de CAT en larva aumentaron respecto a los días anteriores inclusive el control. A excepción de C₂Cl_o, todas las muestras de agua causaron valores de esta enzima significativamente más altos que Ringer ($p < 0,008$, ANOVA). Las actividades enzimáticas halladas en las muestras fueron de: 114,74 UI/mg proteína (48% más que el control) en C₂Cl_n, de 117,39 UI/mg proteína (51% más que el control) en A₃TA_n y de 114,88 UI/mg proteína (48% más que el control) en ICl_n ($p < 0,005$). Todas estas muestras mostraron un aumento promedio de 49% con respecto al control Ringer (77,62 UI/mg proteína). La actividad de CAT en larvas expuestas a C₂Cl_o fue semejante a controles y significativamente menor a las larvas expuestas a las otras muestras de agua ($p < 0,05$).

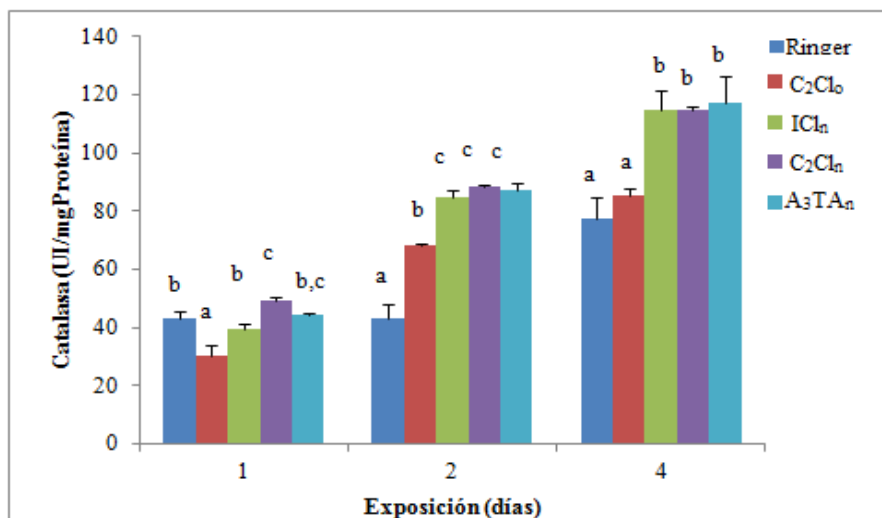


Figura 7.8. Actividad específica de la catalasa (UI/ mg proteína) en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos. Se observan los valores obtenidos de actividad en cada muestra para cada día analizado. Los datos representan la Media \pm ESM de 2 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$) determinadas por Anova factorial-Fisher LSD.

La catalasa es una enzima que actúa como primera defensa de la célula ante la formación de peróxido de hidrógeno y actúa transformándolo en agua y oxígeno. Se localiza principalmente en peroxisomas y es común que su actividad se vea modificada ante la presencia de compuestos como pesticidas. En esta especie se ha observado que los niveles de catalasa se mantienen altos en los primeros estadios de desarrollo (Ferrari *et al.*, 2008). La actividad de la catalasa muestra patrones variables frente a la exposición a carbamatos y fosforados, dependiendo de la intensidad en la producción de EROs. Esta puede incrementarse por la inducción enzimática o inactivarse a través de un efecto inhibitorio directo sobre el grupo hemo de su sitio activo. En general un incremento en su actividad se observa en respuesta a contaminantes ambientales. El estrés oxidativo generado por presiones continuas de algunos fosforados como el metil-azinfos puede desencadenar en un ciclo de inducción o inactivación de la catalasa, y en general la inhibición de la misma está frecuentemente

asociada a una disminución de la GSH o un incremento de la peroxidación lipídica frente a la exposición de piretroides, carbamatos y fosforados (Ferrari *et al.*, 2009).

Las larvas de *R. arenarum* expuestas a las distintas muestras de agua de Tres Arroyos y Claromecó mostraron un efecto inductor en general, que se hizo evidente y significativo desde el segundo día de exposición, y se mantuvo hasta el cuarto día. Esta inducción en CAT puede deberse a una respuesta al estrés oxidativo provocado por la exposición a tóxicos que hayan causado un aumento en especies reactivas de oxígeno (EROs) a través de su detoxificación.

Por otra parte, la muestra de C₂Cl₆ causó una inhibición significativa de CAT al primer día de exposición, y mantuvo los niveles de actividad siempre por debajo a los generados por las demás muestras de agua, aún cuando mostró una inducción relativa a controles al segundo día. Al cuarto día los valores de esta enzima no difirieron a los de la muestra control. Es posible que los niveles de estrés oxidativo y/o de EROs han sido excesivamente elevados en larvas expuestas a esta muestra de agua, causando la inactivación de CAT sobre su centro activo hemo que es muy susceptible al ataque de las EROs que pudiesen estar presentes como productos del estrés oxidativo provocado por el clorpirifos o por la combinación con otro compuesto que no hubiese podido ser identificado en las muestras. Existen evidencias de que en larvas de rana toro (*Lithobates catesbeiana*) expuestas a glifosato se verifica un incremento de actividad de la CAT en el tejido hepático frente al aumento de EROs provocado por este plaguicida (Costa *et al.*, 2008).

La activación o inactivación de esta enzima expuesta a pesticidas en embriones en desarrollo no es inesperada, teniendo en cuenta el desarrollo natural del sistema antioxidante durante la embriogénesis (Ferrari *et al.*, 2009).

7.3.2.2. Actividad de la GST

En la actividad específica de la Glutation S-transferasa, los valores de actividad en larvas expuestas a todas las muestras de agua analizadas no mostraron diferencias significativas en el tiempo de tratamientos, siendo su efecto independiente del mismo (Interacción $p=0,18$ determinada por ANOVA). Todas las muestras produjeron una inducción significativa en la actividad de GST en las larvas expuestas respecto al control ($p<0,0002$, ANOVA) (Figura 7.9a).

Los valores de actividad a lo largo del tiempo de exposición se promediaron para visualizar más claramente los efectos. En la Figura 7.9b se observan los valores promedio de cada muestra que resultaron significativamente mayores al valor del control. La actividad fue de 66,21 mUI/mg proteína en la muestra control, de 76,54 mUI/mg proteína en la muestra C_2Cl_n (un 15% más que el control), de 77,37 mUI/mg proteína en la muestra ICl_n (un 17% de aumento con respecto al control), de 81,34 mUI/mg proteína en la muestra de A_3TA_n (un 23% de aumento) y de 76,69 mUI/mg proteína en la muestra de C_2Cl_o (un 16% de aumento con respecto al control) ($p < 0,008$ Fisher LSD a posteriori).

Los valores aumentaron en promedio un 18% con respecto a la muestra de Ringer; la mayor actividad de GST se observó en el Arroyo 3, seguida por el Inicio en el mes de noviembre. Las menores inducciones de actividad se hallaron en las muestras de la cascada 2 del mes de octubre y de noviembre.

La capacidad de las diferentes muestras de agua de generar una respuesta antioxidante, o también detoxificante en las larvas, se comprueba en la inducción observada sobre la actividad de GST, que mostró una respuesta semejante para todas las muestras de agua, y se manifestó claramente desde el primer día de exposición manteniéndose a lo largo del tiempo hasta los cuatro días. Este efecto de inducción sobre la GST (a las 48 y 96 hs) también se ha observado en la especie *Leptodactylus mystacinus* (Leptodactylidae) perteneciente a una plantación de arroz en la provincia de Entre Ríos (Attademo *et al.*, 2013).

Se ha sugerido que la GST además de actuar como una enzima detoxificante de la Fase II actúa sobre productos de la peroxidación lipídica como son los hidroperóxidos (Lascano, 2012). Esta enzima está regulada por el estrés oxidativo generado por el agotamiento de la GSH, a quién utiliza como co-factor para atacar compuestos no polares, o bien por la activación a través de la Nrf2-ARE.

La inducción de la GST puede contribuir a proteger a los embriones de sapo contra los productos de la peroxidación lipídica ocasionados por el incremento de EROs (Ferrari *et al.*, 2009). La actividad de proteína quinasa C (PKC) se incrementa por estos compuestos, fosforilando y activando al factor heterodímero c-Jun/Nrf2, el cual aumenta la transcripción de GST a través de la interacción y unión al Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE), en zonas regulatorias del ADN (Ferrari *et al.*, 2009; Lascano *et al.*, 2009; Sotomayor, 2011).

Nuestros resultados coinciden con los publicados por otros autores que muestran que tanto a concentraciones bajas (0,02 y 2 ppm) como altas (6 y 9 ppm) de metil-azinfos, en la especie *R. arenarum* pertenecientes al estadio de opérculo completo, la actividad de la GST se ve inducida tanto en ensayos realizados a campo como en laboratorio (Ferrari *et al.*, 2009; Lascano *et al.*, 2009; Rosenbaum *et al.*, 2012). El mismo efecto se ha registrado para el carbamato carbaril a concentraciones de 10 y 20 ppm en la misma especie y estadio (Ferrari *et al.*, 2009; Ferrari *et al.*, 2011). La inducción de la GST también se observó en la misma especie de anfibio para los fosforados malatión y paratión y los clorados Lindano y Dieldrin (Anguiano *et al.*, 2001).

En otras especies de vertebrados como los peces también se ha registrado un aumento de la GST frente a la acción de diferentes tóxicos presentes en el agua, como el caso de la perca trepadora (*A. testudineus*) expuesta a efluentes industriales (Almar *et al.*, 1998) o *O. mykiss* expuesta a 1 y 3 mg/l de carbaril (Ferrari *et al.*, 2007).

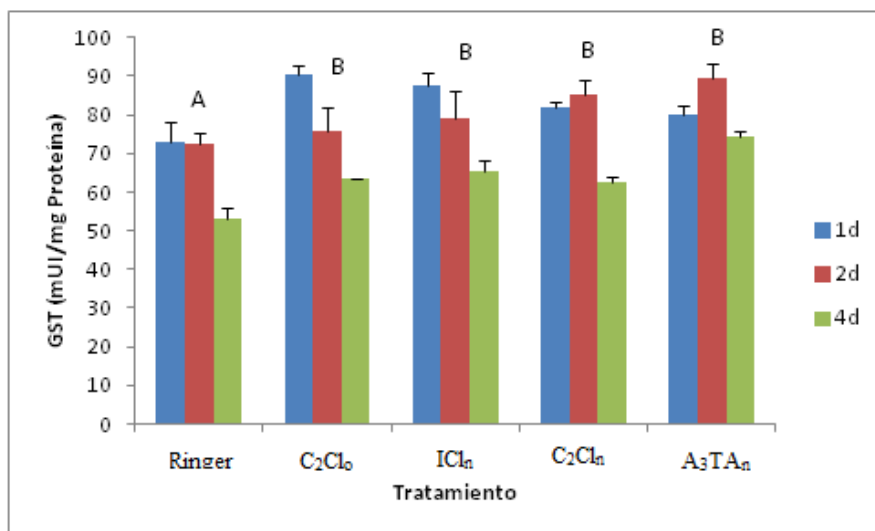


Figura 7.9a. Actividad de GST (mUI/mg proteína) en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos. Se observan los valores obtenidos de actividad en cada muestra para cada día analizado. Los datos representan la Media \pm ESM de 2 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$) determinadas por Anova factorial –Fisher LSD. GST: glutatión S-transferasa.

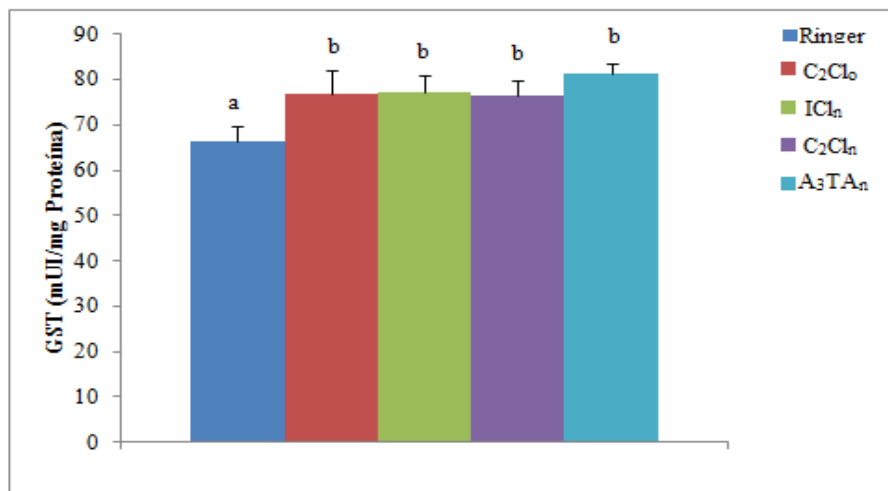


Figura 7.9b. Actividad promedio de GST (mUI/ mg proteína) en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos. Los valores que se observan en dicha figura son los promedios de actividad de cada muestra a lo largo de las 96 hs que duró la experiencia. Los datos representan la Media \pm ESM de 2 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado (n=12). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$) determinadas por Anova factorial –Fisher LSD. GST: glutatión S-transferasa.

7.3.2.3. Nivel de glutatión reducido

Los niveles de GSH sufrieron variaciones en las larvas expuestas a las distintas muestras de agua, y en forma diferente a lo largo del tiempo de exposición (ANOVA factorial, interacción $p < 0,0005$). Por consecuencia, el análisis se realizó en forma separada para cada día de exposición.

En el día 1 no se observaron diferencias significativas entre las muestras y el control. El promedio del contenido endógeno de GSH de todas las muestras fue de 12,43 nmol/larva. (Figura 7.10)

En el día 2 se encontraron efectos significativos para la exposición a las distintas muestras de agua (ANOVA, $p < 0,00004$), siendo los valores endógenos de GSH en las larvas expuestas a control (14,07 nmol/larva) y en la muestra C₂Cl₃ (15,52 nmol/larva)

significativamente menores al resto ($p < 0,004$ Fisher LSD), pero no mostrando diferencias entre ellas. Los niveles encontrados para el resto fueron de 19,27 nmol/larva (37% más que el control) en el A₃TA_n, de 18,31 nmol/larva (30% más que el control) en el ICl_n y de 19,80 nmol/larva (41% más que el control) en la muestra correspondiente a C₂Cl_o.

En el día 4 todos los valores de GSH en larvas expuestas disminuyeron en relación a los hallados a las 48 hs, retornando a niveles semejantes al control que mantuvo los mismos niveles endógenos de GSH. Solo las larvas expuestas a la muestra correspondiente a la cascada 2 del mes de noviembre mostraron valores significativamente menores al valor control (20,1% de disminución; $p < 0,03$) y al resto de las muestras.

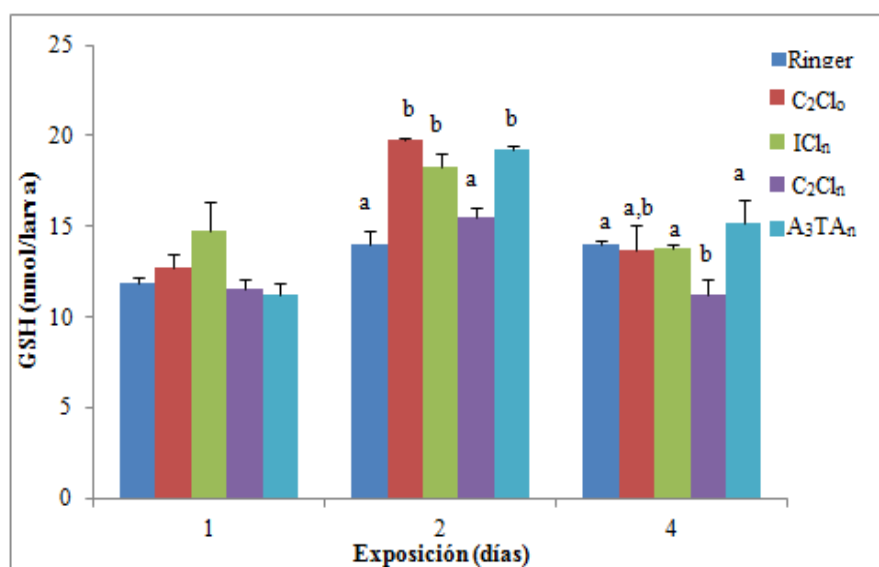


Figura 7.10. Niveles endógenos de GSH (nmol/larva) en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos. Se observan los valores obtenidos de actividad en cada muestra para cada día analizado. Los datos representan la Media \pm ESM de 2 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$) determinadas por Anova factorial –Fisher LSD.

Los valores de GSH en larva también confirman en general una respuesta antioxidante, ya que en la mayoría de las muestras se observó un aumento de la cantidad de glutatión reducido a las 48 hs, infiriendo un estrés oxidativo previo que provocaría la inducción de las enzimas de síntesis de GSH. Los contaminantes estarían induciendo la síntesis de GSH a través de un incremento de la expresión de la enzima γ -glutamylcisteina sintetasa que se halla regulada por el elemento de respuesta antioxidante Nrf2-ARE. (Fainstein, 2007; Ferrari *et al.*, 2009; Niture *et al.*, 2010; Sotomayor, 2011).

El incremento de glutatión reducido se manifestó al segundo día de exposición, de manera semejante a lo observado para la actividad de la catalasa. Sin embargo, este efecto no se sostuvo al cuarto día, sugiriendo un aumento en la proporción y efectos de las EROs. Nuestros resultados coinciden con los registrados por Sotomayor (2011) en embriones expuestos a concentraciones de clorpirifos de 2 y 8 ppm en los cuales se observó un incremento del 18% del GSH endógeno que podría estar neutralizando los radicales libres generados por los contaminantes y actuando así como agente antioxidante. Para el carbaril también se observó una tendencia al incremento de GSH a concentraciones de 10 y 20 ppm (Ferrari *et al.*, 2011).

La excepción a lo observado fue la muestra de agua de Cascada 2 del arroyo Claromecó del mes de noviembre, que provocó al cuarto día de exposición una caída significativa en los niveles de GSH. Estos resultados podrían estar sugiriendo una situación de estrés oxidativo en la cual la respuesta inductiva a la síntesis de GSH, observada en el resto de las muestras, podría haberse visto superada por el impacto de EROs que pudieron dañar macromoléculas y atacar a proteínas involucradas, además de ser sustrato de otras enzimas como la GST (Ferrari *et al.*, 2009; Lascano *et al.*, 2011; Sotomayor, 2011). Efectos similares se observaron para el metil-azinfos y carbaril para embriones de *R. arenarum* pertenecientes a la última etapa de desarrollo y para la especie *O. mykiss* (Ferrari *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2009; Lascano *et al.*, 2011). Rosenbaum *et al.* (2012) expusieron larvas de *R. arenarum* a 0,02 mg/l y 2 mg/l de metilazinfos por cuatro horas y obtuvieron una disminución de 19% y 46% de la GSH. Luego de los dos días de recuperación se mantuvo la inhibición con respecto a los controles siendo de 33 y 56%. A los 7 días de recuperación los niveles a 0,02 ppm se recuperaron siendo similares al control, mientras que a 2 ppm se mantuvo una disminución del 10%. No obstante, en exposiciones *in situ* de larvas de *R. arenarum* realizadas por los

autores en canales de riego que reciben potencialmente plaguicidas por tratamiento de frutales, se pudo observar también la inducción de GSH luego de una a dos semanas de monitoreo.

En resumen, nuestros resultados podrían ser coincidentes con los registrados por otros autores con el metil-azinfos en los cuáles se observó un aumento de GSH con respecto al control, a concentraciones bajas de 0,5 mg/l, dependiendo del tiempo de exposición para observar la respuesta inductora o la recuperación de GSH. A mayores concentraciones, por encima de 2 mg/l, se observaría el efecto contrario, con un descenso progresivo de la concentración de GSH, que estaría indicando la biotransformación de los plaguicidas y el consumo de las defensas antioxidantes (Lascano *et al.*, 2009).

7.3.2.4. Nivel de peróxidos

Los niveles de peróxidos en larvas mostraron valores bajos de concentración prácticamente en el límite de detección de la técnica, con una importante variabilidad en algunos casos. Se observó una interacción en los efectos entre las muestras y el tiempo de exposición (ANOVA interacción $p < 0,002$). En los días 1 y 4 no se observaron diferencias significativas entre las muestras y el control para los niveles de peróxidos en las larvas expuestas (datos no mostrados). En el día 2 se observaron valores significativamente más altos en larvas expuestas a aguas de los arroyos C₂Clo (110% mayor) e InCln (43%) con respecto a Ringer (Figura 7.11; $p < 0,05$).

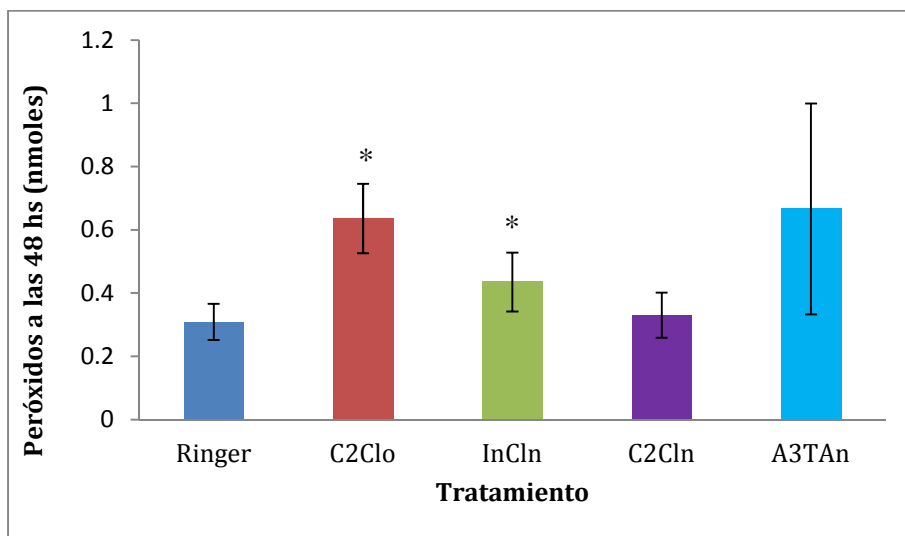


Figura 7.11. Niveles endógenos de lipoperóxidos (nmol) en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos a las 48 hs de exposición. Los datos representan la Media \pm ESM de 2 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas con el control ($p < 0,05$) determinadas por Anova factorial –Fisher LSD.

El MDA es el mayor producto de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, y un aumento en el mismo indica la peroxidación lipídica ocasionada por la acción de los EROs (Oruc y Uner, 2000).

Los niveles de peróxidos en larvas expuestas durante dos días a muestras de agua del arroyo Claromecó (Inicio, Cascada 2-mes de octubre) sugerirían un cierto grado de estrés oxidativo que supera las defensas antioxidantes. Sin embargo, estos resultados deben analizarse con cuidado ya que los valores obtenidos son bajos, y se consideran orientativos. La respuesta observada en C2Clo podría relacionarse con la menor inducción de CAT respecto a las otras muestras en el sentido de que podría haber un mayor estrés oxidativo que justifique ambas respuestas en los biomarcadores.

7.3.3. Efectos sobre blancos primarios y secundarios de contaminantes anticolinesterásicos

7.3.3.1. Actividad de la Acetilcolinesterasa (AChE)

No se detectaron diferencias significativas entre embriones control y aquellos expuestos a las diferentes muestras de agua analizadas a lo largo de todo el tiempo de exposición. La actividad específica de AChE promedió un valor de 139,64 mUI/mg proteína y se mantuvo constante a lo largo de toda la experiencia (Figura 7.12).

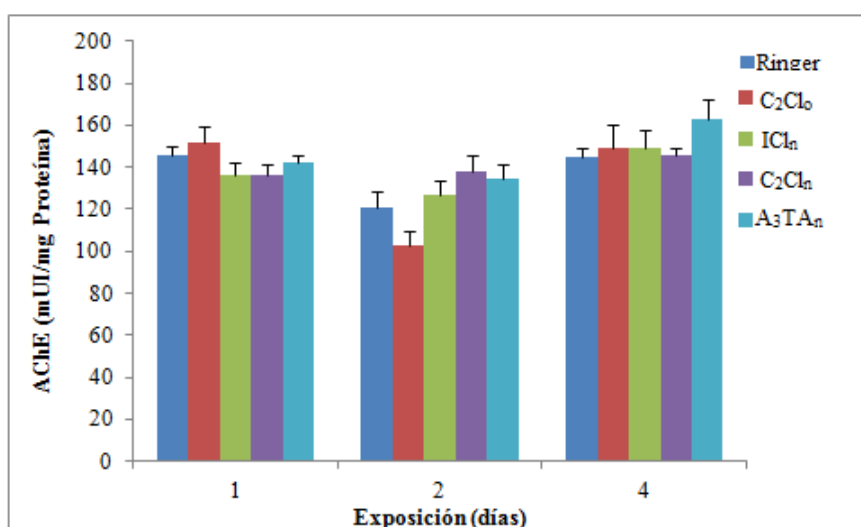


Figura 7.12. Actividad específica de la Acetilcolinesterasa (AChE) (mUI/ mg proteína) en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos. Los datos representan la Media \pm ESM de 2 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado. El test estadístico utilizado fue un Anova factorial-Fisher LSD. No se encontraron diferencias significativas entre días, ni sobre los efectos de las muestras de agua

7.3.3.2. Actividad de la Carboxilesterasa (CE)

Se observaron efectos dependientes del tiempo de exposición a las distintas muestras de agua en larvas de *R. arenarum* (interacción $p < 0,0004$, ANOVA factorial). Por tal motivo, se procedió al análisis de los efectos de las muestras en cada tiempo de exposición.

En el día 1 solo la muestra correspondiente al arroyo 3 (24,78 mUI/mg proteína) del mes de noviembre produjo un valor significativamente menor en larvas (25%) comparado con el control (33,22 mUI/mg proteína) ($p < 0,02$) (Figura 7.13).

En el día 2 la actividad de la CE fue inhibida en larvas expuestas a C₂Cln, C₂Clo y InCln respecto al control Ringer en un promedio de 27% (ANOVA, $p < 0,002$). Los valores de actividad obtenidos fueron de: 20,37 mUI/mg proteína (un 27% menor a Ringer) en la muestra correspondiente al C₂Cln, de 21,97 mUI/mg proteína en el C₂Clo (un 21 % menor a Ringer), de 18,24 mUI/mg proteína en el InCln (un 34 % menor al control) y de 27,85 mUI/mg proteína en la muestra control.

En el día 4 si bien todos los valores de actividad de CE disminuyeron, solo la muestra C₂Cln mostró un valor de actividad significativamente menor al control (29 %, $p < 0,002$).

Si bien no se detectaron efectos significativos sobre la actividad de AChE en las larvas de *R. arenarum* expuestas a las diferentes muestras de agua, los efectos sobre la actividad de CE mostraron una inhibición significativa que sugiere la exposición y efecto de compuestos anticolinesterásicos, como OFs y carbamatos. Attademo *et al.* (2011) observaron que la CE aumentaba cuando la especie de anfibio *Leptodactylus chaquensis* era expuesta a metamidofos, mientras que disminuía en zonas de aplicación de endosulfán y cipermetrina.

Algunos autores han observado que a bajas concentraciones de metil-azinfos (0,02 ppm) la CE se ve inhibida en un 30% mientras que la AChE no muestra ninguna variación significativa (Rosenbaum *et al.*, 2012). Sin embargo, a concentraciones mayores de metil-azinfos (3 ppm), malation (4 ppm) y carbaril (10 ppm) tanto la CE como la AChE se ven significativamente inhibidas en embriones de *R. arenarum* (Venturino *et al.*, 2001; Ferrari *et al.*, 2011). Para la especie *X. laevis* se han registrado descensos de la actividad de AChE pero a altas concentraciones de clorpirifos (≥ 100 ppb) (Colombo *et al.*, 2005). Jokanovic' (2001) sugiere que la enzima CE es la más importante en la biotransformación y detoxificación de compuestos organofosforados ya que la formación de paraoxón muestra una mayor afinidad a

ésta en comparación a la AChE. Sin embargo, esto no se cumpliría en todas las especies de vertebrados, ya que Ferrari *et al.* (2007) observaron una mayor inhibición en carbamatos que en fosforados para la especie *O. mykiss.*). Jokanovic (2001) sugiere además que la CE también participa en la detoxificación de otros insecticidas como las piretrinas. También se ha observado en la especie *R. arenarum* que para cuatro formulaciones del herbicida glifosato (48 hs) los niveles de CE son significativamente inhibidos en relación a los controles (Lajmanovich *et al.*, 2011).

El efecto observado en la disminución de la enzima CE, blanco secundario de OFs y carbamatos, sería la protección del blanco primario AChE actuando sobre estos tóxicos como una molécula suicida al quedar irreversiblemente unida a estos compuestos (Lajmanovich *et al.*, 2010; Ferrari *et al.*, 2011) y que su inhibición transitoria no pondría en riesgo la supervivencia de los individuos, que dependiendo de los niveles de CE podrían persistir en esos agroecosistemas altamente contaminados (Lajmanovich *et al.*, 2010).

En los peces la disminución de la acetilcolinesterasa parecería ser un buen indicador de compuestos fosforados y carbamatos (Gruber y Munn, 1998; Ferrari *et al.*, 2004). Sin embargo en este estudio y de manera similar a lo registrado por Rosenbaum y col. (2012) la AChE en larvas de *R. arenarum* no funcionaría como un buen indicador de contaminación por estos plaguicidas.

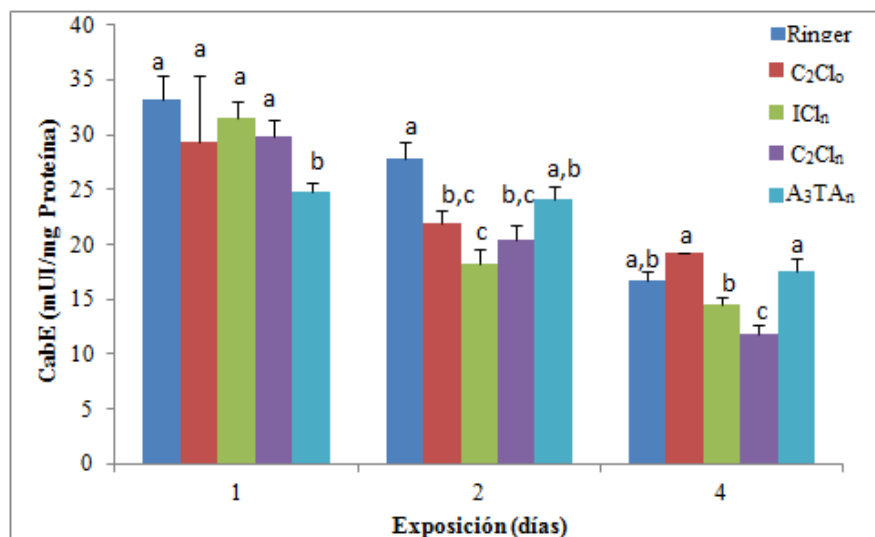


Figura 7.13. Actividad específica de la carboxilesterasa (CabE) (mUI/ mg proteína) en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a aguas de diferentes arroyos de la localidad de Tres Arroyos. Los datos representan la Media \pm ESM de 2 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$) determinadas por Anova factorial-Fisher LSD.

7.3.3.3. Niveles de proteínas

El contenido de proteínas totales en embriones de *Rhinella arenarum*, provenientes de ovulaciones de hembras distintas, no mostró diferencias significativas con respecto a los controles. El promedio general del contenido de proteínas totales por larva fue de 99,05 μ g/larva.

En la Figura 7.14 se observan los promedios para ambos tratamientos (ovulaciones) para cada una de las muestras de agua en todos los días analizados.

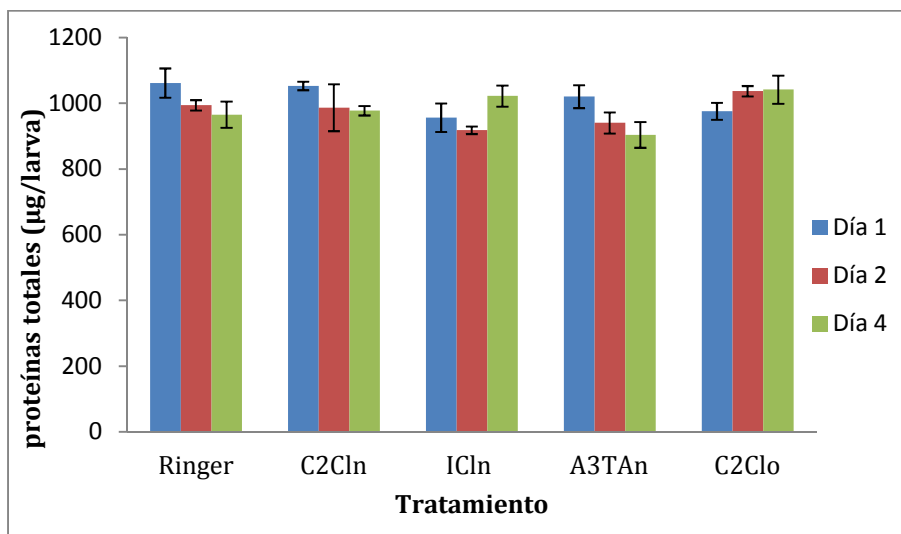


Figura 7.14. Se observan los niveles promedios de proteína de ambas ovulaciones para cada muestra de agua en todos los días analizados en embriones de *Rhinella arenarum*. Los datos representan la Media \pm ESM de 2 experimentos independientes ($n=4$), cada medición se realizó por duplicado. El análisis estadístico se realizó con un Anova factorial –Fisher LSD y no presentó diferencias significativas entre las muestras y el control.

Los niveles inalterados de las proteínas larvales son acordes al buen estado general que presentaron las larvas de *R. arenarum* durante todo el experimento, sugiriendo que las alteraciones observadas en los biomarcadores bioquímicos corresponden a manifestaciones subclínicas/subpatológicas o subletales de algunos de los compuestos existentes en las muestras de agua provenientes de la localidad de Tres Arroyos.

7.4. CONCLUSIONES

Nuestros resultados estarían confirmando que la presencia de trazas de contaminantes orgánicos en el agua de Tres Arroyos y Claromecó determinada analíticamente, causa alteraciones en organismos como *R. arenarum*, debido a que se observó en las diferentes muestras una inducción del sistema antioxidante: catalasa, GST y GSH. En estos tres casos la presencia de compuestos tóxicos estaría provocando la síntesis de *novó* a través de diferentes

mecanismos dados por el incremento de EROs, que para la GST y GSH se producirían a través de Nrf2.

Para el caso particular de clorpirifos, hay indicios de que las concentraciones halladas en las diferentes muestras podrían estar generando EROs a las mayores concentraciones de este insecticida. Sin embargo, esto no puede asegurarse dado que en la zona de estudio se utiliza otro fosforado como es el dimetoato y ciertos piretroides como la cipermetrina y la lambdacialotrina. Solo la cipermetrina pudo ser analizada en las muestras pero no fue detectada. Por otra parte, es sabido que el glifosato es un pesticida ubicuo y que la exposición a diferentes formulados de este compuesto genera en renacuajos de *R. arenarum* cambios en las actividades de la AChE, BChE, carboxilesterasa y la glutatión-S-transferasa.

Las mayores concentraciones de clorpirifos se detectaron en el inicio del A° Claromecó en el mes de noviembre de 2011 (0,16 µg/l) y a la altura de la cascada 2 en el mes de octubre (0,06 µg/l). En estos dos sitios se observaron disminuciones de la CE a las 48 hs, principalmente en el inicio, además de formación de peróxidos. La presencia de compuestos anticolinesterásicos también se hizo presente en el resto de las muestras de agua dado por el descenso de CE a las 24 hs (A ° 3 de Tres Arroyos) y a las 48 y 96 hs (cascada 2 de noviembre).

Nuestros resultados no han permitido obtener una clara relación causa-efecto del clorpirifos con los cambios obtenidos en los sistemas antioxidantes y en algunas de las enzimas detoxificantes en *R. arenarum*, teniendo en cuenta que varios compuestos pueden generar estos cambios en estos organismos y que son capaces de interactuar químicamente cuando se combinan en una mezcla. Sin embargo, no hemos podido detectar otros compuestos en nuestros análisis químicos de aguas. Las interacciones sinérgicas dadas por combinaciones de contaminantes ocasionan disminución de la supervivencia, perturbaciones inmunológicas y otras consecuencias indirectas como parásitos, enfermedades y otros factores de estrés ambiental. Existen evidencias en la salamandra tigre que relacionan la disminución de la supervivencia de esta especie por la exposición a virus, generada por concentraciones subletales de clorpirifos de solo 2 µg/l.

Finalmente, podemos aseverar que la calidad de agua de algunos de los arroyos de Claromecó y tres Arroyos no es apta para la biota acuática, dado que genera en especies sensibles como *R. arenarum* cambios fisiológicos que podrían disminuir su supervivencia.

7.5. REFERENCIAS

Adams S.M. (2001) Biomarker/bioindicator response profiles of organisms can help differentiate between sources of anthropogenic stressors in aquatic ecosystems. *Biomarkers*, 6 (1): 33–44.

Attademo A.M., Cabagna-Zenklusen M., Lajmanovich R.C., Peltzer P.M., Junges C., Basso A. (2011) B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province, Argentina. *Ecotoxicology*, 20: 274–282.

Attademo A.M., Peltzer P.M., Lajmanovich R.C., Cabagna-Zenklusen M.C., Junges C.M., Basso A. (2013) Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185 (10).

Albendín García M. G (2009) Caracterización de las colinesterasas presentes en cerebro y músculo de dorada (*Sparus aurata*) y estudio de su inhibición por insecticidas organofosforados. Tesis doctoral. UNIVERSIDAD DE CÁDIZ, Área de Toxicología.

Almar M., Otero L., Santos C. y Gonzalez Gallego J. (1998) Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 33: 769-783.

Anguiano O.L., Caballero de Castro A.C., Pechen de D'Angelo A.M. (2001) The role of glutathione conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides. *Comp. Biochem Physiol. Part C*, 128: 35-43.

Bionda C., Gari N., Luque E., Salas N., Lajmanovich R., Martino A., di Tada I. (2012) Demografía poblacional de *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) y *Physalaemus biligonigerus* (Anura: Leiuperidae) en agroecosistemas de la provincia de Córdoba, Argentina *Rev. Biol. Trop.*, 60 (2): 771-779.

Castro G.D., Castro J. A. (2008) Curso Toxicología I: "Toxicocinética. Mecanismos de Toxicidad" Centro de Investigaciones Toxicológicas (CEITOX), CITEFA-CONICET.

Colombo A., Orsi F. y Bonfanti P. (2005) Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae. *Chemosphere*, 61: 1665–1671.

Costa M.J., Monteiro D.A., Oliveira-Neto A.L., Rantin F.T., Kalinin A.L. (2008). Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology*, 17: 153–163.

Fainstein M. K. (2007) Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB*, 26(1): 18-25.

http://computo.sid.unam.mx/Bioquimica/PDF/2007/01/g_HisNuevoFactor.pdf

Ferrari A., Venturino A., Pechén de D'Angelo A.M. (2004). Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 420–425.

Ferrari A., Venturino A., Pechén de D'Angelo A.M. (2007). Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88: 134–142.

Ferrari A., Anguiano L., Lascano C., Sotomayor V., Rosenbaum E. y Venturino A. (2008) Changes in the Antioxidant Metabolism in the Embryonic Development of the Common South American Toad *Bufo arenarum*: Differential Responses to Pesticide in Early Embryos and Autonomous-Feeding Larvae. *J. BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY*, 22, N° 4.

Ferrari A., Lascano C.I., Anguiniano O.L., Pechén de D'Angelo A.M. y Venturino A. (2009) Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaril during the embryonic development of the toad *Rhinella (Bufo) arenarum* Hensel. *Aquatic Toxicology*, 93: 37–44.

Ferrari A., Lascano C., Pechen de D'Angelo A.M., Venturino A. (2011) Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry Physiology*, 153: 34-39.

Fukuto R.T. (1990) Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Persp.*, 87:245-254.

Gruber S.J., Munn M.D. (1998) Organophosphate and carbamate insecticides in agricultural waters and cholinesterase (ChE) inhibition in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35: 391-396.

Gupta R.C. (2006). *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*: Elsevier Academic Press.

Izaguirre M.F., Marín L.; Vergara M.N.; Lajmanovich R.C., Peltzer P., Casco V.H. (2006) Modelos experimentales de anuros para estudiar los efectos de piretroides. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 32: 181-206.

Jokanovic M. (2001) *Biotransformation of organophosphorus compounds*, Toxicology 166: 139–160.

Kerby J.L., Storfer A. (2009) Combined Effects of Atrazine and Chlorpyrifos on Susceptibility of the Tiger Salamander to *Ambystoma tigrinum* Virus. *EcoHealth*, 6: 91–98.

Lajmanovich R., De La Sierra P., Marino F., Peltzer P., Lenardón A., Lorenzatti E. (2005) Determinación de residuos de organoclorados en vertebrados silvestres del Litoral Fluvial de Argentina. *Temas de la Biodiversidad del Litoral fluvial argentino II INSUGEO, Miscelánea*, 14: 389 – 398.

Lajmanovich R.F., Peltzer P.M., Junges C.M., Attademo A.M., Sanchez L.C., Basso A. (2010) Activity levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Parana' River floodplain: Implication for ecological risk assessment of soybean crops. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 1517–1524.

Lajmanovich R.C., Attademo A.M., Peltzer P.M., Junges C.M., Cabagna M.C. (2011) Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 60: 681–689.

Lascano C. I., Sotomayor V., Ferrari A., Venturino A. (2009) Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta Toxicol. Argent.*, 17 (1): 8-19.

Lascano C. I., Ferrari A. y Venturino A. (2011) Sublethal concentrations of azinphos-methyl induce biochemical and morphological alterations in *Rhinella arenarum* embryos. *Chemistry and Ecology*, 27 (6): 557–568.

Lascano C.I. (2012) Impacto del plaguicida organofosforado metilazinfos sobre el metabolismo de poliaminas en el desarrollo embrionario del sapo común (*Rhinella arenarum*), Universidad Nacional del Comahue, trabajo de tesis para optar al Título de Doctor en Biología.

McCarty L.S., Power M., Munkittrick K.R. (2002) Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8: 159–164.

Niemi G.J., Hanowski J.M., Lima A.R., Nicholls T., Weiland N. (1997) A critical analysis on the use of indicator species in management. *Journal of Wildlife Management*, 61: 1240–1252. Citado en: Goodsell P.J., Underwood A.J., Chapman M.G. (2009) Evidence necessary for taxa to be reliable indicators of environmental conditions or impacts. *Marine Pollution Bulletin*, 58: 323–331.

Niture S.K., Kaspar J.W., Shen J., Jaiswal A.K. (2010) Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 244: 37–42.

Oruç E.Ö. y Üner N. (2000) Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 127 (3): 291–296.

Peltzer P.M., Lajmanovich R.C., Sánchez-Hernandez J.C., Cabagna M.C., Attademo A.M., Basso A. (2008) Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. Ecotoxicology and Environmental Safety, 70: 185–197.

Peltzer P.M., Junges C.M., Attademo A.M., Bassó A., Grenón P., Lajmanovich R. (2013) Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. Ecotoxicology, 22: 1165–1173.

Rosenbaum E.A., Duboscq L., Soleño J., Montagna C.M., Ferrari A. y Venturino A. (2012) Response of biomarkers in amphibian larvae to in situ exposures in a fruit-producing region in north Patagonia, Argentina. Environmental Toxicology and Chemistry, 31 (10): 2311–2317.

Rodriguez E.M. (2006) Biomarcadores en fauna acuática: estudios de campo y de laboratorio, en un contexto ecotoxicológico, pp: 459-479. Genética Toxicológica. Editorial de los Cuatro Vientos..

Sanchez L.C., Peltzer P.M., Lajmanovich R.C., Manzano A.S., Junges C.M., Attademo A.M. (2013) Actividad reproductiva de anuros en un paisaje predominantemente agrícola del centro-este de Argentina. Revista Mexicana de Biodiversidad, 84: 912-926.

Sotomayor V. (2011) Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la expresión génica de embriones de *Rhinella arenarum*. Mecanismos de acción y vías de señalización. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, Químicas y del Medio Ambiente (LIBIQUIMA), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, tesis doctoral.

Sotomayor V., Lascano C. I., Pechen D'Angelo A. M. y Venturino A. (2012) Developmental and polyamine metabolism alterations in *Rhinella arenarum* embryos exposed to organophosphate chlorpyrifos. Environmental Toxicology and Chemistry, 31 (9): 2052–2058.

Venturino A., Gauna L., Bergoc R. M., Pechen de D'Angelo A. M. (2001) Toxicokinetics of Malathion in Larval Stages of the Toad *Bufo arenarum* (Hensel): Effect of Exogenous Spermidine. Pesticide Biochemistry and Physiology, 70: 142–150.

-CAPÍTULO 8-

EVALUACIÓN DE RIESGO ECOLÓGICO DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS EN LOS AMBIENTES ACUÁTICOS DE TRES ARROYOS Y CLAROMECÓ

8.1. INTRODUCCIÓN

8.1.1. Descripción de la evaluación de riesgo ecológico

La evaluación del *riesgo ecológico* se inicia, en los Estados Unidos, en la década de los ochenta, cuando se identifica la necesidad de iniciar la implementación de técnicas de evaluación para determinar el impacto que sobre el medio ejercían las actividades humanas. La evaluación de riesgo ecológico es un proceso de asignación de magnitudes que evalúa la probabilidad de que ciertos efectos ecológicos adversos puedan ocurrir o estén ocurriendo como resultado de la exposición a uno o más factores estresantes sobre individuos, poblaciones, comunidades o ecosistemas. Es una herramienta muy utilizada para la protección del medio ambiente, en la identificación de problemas ambientales y el establecimiento de prioridades, a través de una base científica que sirva en la elaboración de decisiones y/o medidas regulatorias por parte de gestores ambientales (USEPA, 1992), desde

la economía hasta la protección de los ecosistemas. En años recientes, los procedimientos de evaluación de riesgos se han desarrollado y documentado (USEPA, 1998). Dado que en la mayoría de los casos no es posible la eliminación del uso de agroquímicos tóxicos, las agencias u organismos de protección ambiental deben definir la proporción tolerable de mortalidad o la reducción del crecimiento de las especies expuestas (Castillo G., 2004; Badii y Almanza, 2005).

Uno de los aspectos importantes en toxicología y ecotoxicología es la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto nocivo que le produce. Esta relación es conocida como la dosis-respuesta y constituye la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por las sustancias químicas en el ambiente (Castillo G., 2004).

Existen muchas formas de determinar la toxicidad, y aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de gran utilidad, el indicador comúnmente más utilizado es la muerte del organismo de prueba. La mayoría de las pruebas de toxicidad suministran una estimación de la dosis (o concentración en el alimento, aire o agua) que produce una respuesta tóxica a un nivel del 50%. Por ejemplo, la dosis letal media es la dosis o concentración que mata al 50% de la población (CL_{50} : concentración letal 50) (Castillo G., 2004). La evaluación de riesgo ecológico se define como un proceso que evalúa la probabilidad de que los efectos ecológicos adversos puedan ocurrir o estén ocurriendo como resultado de la exposición a uno o más factores estresantes. Un riesgo no existe a menos que (1) el factor de estrés tenga la capacidad intrínseca de producir uno o más efectos adversos y (2) que el contacto con un componente ecológico (es decir, organismos, poblaciones, comunidades o ecosistemas) ocurra el tiempo suficiente y con una intensidad suficiente para provocar el efecto adverso identificado. La evaluación de riesgo ecológico puede evaluar uno o más factores de estrés en uno o varios componentes ecológicos (USEPA, 1992).

Como se mencionó anteriormente, el proceso puede identificar los riesgos existentes o pronosticar aquellos que aún no están presentes en el ambiente (USEPA, 1992; Dirección de Desarrollo Sectorial Sostenible del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia, 2007). El enfoque cuantitativo que hemos utilizado para evaluar los efectos del clorpirifos sobre las poblaciones de invertebrados y vertebrados acuáticos con un nivel 2-3 de análisis, nos permitió incluir una amplia variedad de organismos, inclusive aquellos que no

son abundantes en nuestra zona de estudio, pero que representan una importante fuente de información sobre la sensibilidad de un gran número de taxones acuáticos al insecticida (Albariño *et al.*, 2007).

8.1.2. Métodos utilizados para los análisis de riesgo de pesticidas

El riesgo ecológico puede ser expresado de una variedad de formas diferentes, mientras que algunas evaluaciones pueden proporcionar verdaderos cálculos probabilísticos, tanto de los efectos adversos como de los elementos de exposición, otras pueden ser de naturaleza determinista¹ o cualitativa. En estos últimos dos casos, la probabilidad de efectos adversos se expresa a través de una comparación semi-cuantitativa o cualitativa de los efectos y la exposición (USEPA, 1992). El riesgo es una función de la exposición y la toxicidad, y por lo tanto la evaluación del riesgo se basa en la caracterización de la exposición y sus efectos (ECOFRAM, 1999a).

En general, son tres los métodos que se discuten para ilustrar la integración del factor estrés-respuesta y los perfiles de exposición a los contaminantes. El análisis de la exposición y los efectos es lo que se conoce como toxicidad. La elección final del método dependerá de la evaluación que se quiera realizar, como así también las limitaciones de tiempo y de datos (USEPA, 1992).

Éstos van en orden creciente de complejidad y de potencial realismo:

(1) Se compara solo el efecto y el valor de exposición. Son cocientes que calculan la relación entre valores individuales de exposición y se los divide por la toxicidad (USEPA, 1992), ejemplos de este tipo de cálculos son los RQ (cociente de riesgo).

1. Se llama determinista al experimento o fenómeno que da lugar a un resultado cierto o seguro, es decir, cuando partiendo de unas mismas condiciones iniciales tenemos la certeza de lo que va a suceder. La relación causa-efecto se conoce en su totalidad. En cambio un resultado probabilístico habla de la aleatoriedad del suceso o los resultados.

Muchas evaluaciones de riesgo comparan los valores de efectos (LC_{50} o IC_{50} : concentración inhibitoria 50) con los niveles estimados o medidos del contaminante. Estos cocientes deben ser utilizados con factores de incertidumbre o de seguridad para ajustar sus valores. Estos cocientes proporcionan la estimación del riesgo, si el valor es igual a un determinado nivel de preocupación que por lo general es el número uno (USEPA, 1992).

El método del cociente (RQ) ha sido utilizado ampliamente para evaluar los riesgos de los factores químicos de estrés. Aunque éste método es comúnmente usado y aceptado, es el menos probabilístico de todos los enfoques y depende del correcto juicio del profesional que lo utilice (USEPA, 1992). Otras dificultades que presenta es que no proporciona ninguna información acerca de la probabilidad de que un riesgo sea inaceptable (ECOFRAM, 1999a).

Abordar las cuestiones de la probabilidad o magnitud del riesgo requiere de enfoques alternativos que incorporen lo que sabemos acerca de los parámetros medidos o estimados y su incertidumbre asociada (USEPA, 1992; ECOFRAM, 1999a).

(2) Son métodos que comparan las distribuciones de los efectos y exposiciones. El riesgo se cuantifica por el grado de solapamiento entre las dos distribuciones, cuanto mayor es el solapamiento mayor es el riesgo. Permite predecir la magnitud y la probabilidad de los efectos, identificando las variables principales de incertidumbre y definiendo o estimando los parámetros de la distribución (por ejemplo, tipo de distribución, la media, la varianza y correlación con otras variables inciertas). En este tipo de análisis hay que tener cuidado a la hora de asumir la independencia de los datos o al correlacionar las variables introducidas (USEPA, 1992; ECOFRAM, 1999a).

En este tipo de evaluaciones se estiman las probabilidades porcentuales acumuladas, como el porcentaje de organismos afectados negativamente por los plaguicidas que será (1) menor que o igual a, o (2) mayor a algún porcentaje dado de preocupación. Se generan mediante la integración de las distribuciones estimadas de dosis (que constituyen una evaluación de la exposición) con las distribuciones de dosis-respuesta experimentales (LC_{50} o EC_{50} : concentración efectiva 50) y la pendiente de dosis-respuesta (que constituye una evaluación de los efectos) (ECOFRAM, 1999a).

Las distribuciones de las variables independientes (entrada) o las variables dependientes (de salida) para cualquier ecuación, pueden presentarse como funciones de

densidad de probabilidad y/o como funciones de distribución acumulada. Las primeras son distribuciones estadísticas que dan la probabilidad fraccional (como una función de una variable aleatoria (x) de que cualquier valor de la distribución seleccionado al azar será igual a x. Las funciones de distribución acumulativa son una integral de la primera desde un límite inferior “ α ” a cualquier valor “v” \leq al límite superior “ β ” (Ecuación 1) (ECOFRAM, 1999a).

$$F(v) = \int_{\alpha}^v f(x) dx \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde $F(v)$ es el área debajo de la curva desde “ α ” hasta “v” y donde $F(x)=1$, el área completa debajo de la curva está representada por la (Ecuación 2), siendo:

$$F(x) = \int_{\alpha}^{\beta} f(x) dx \quad (\text{Ecuación 2})$$

Alternativamente, el riesgo puede ser visto como una función de la dosis y de la sensibilidad (tolerancias) de organismos no blanco, donde la sensibilidad de un organismo individual, se define como la dosis umbral requerida para causar un efecto adverso como la muerte, el crecimiento y/o la reproducción (ECOFRAM, 1999a). Las funciones dosis-respuesta y la sensibilidad están estrechamente relacionados, debido a que una función dosis-respuesta representa la distribución acumulada de la distribución de probabilidad de la sensibilidad (ECOFRAM, 1999a).

Los ensayos de toxicidad en el laboratorio dan como resultado curvas sigmoideas que representan la dosis de un determinado pesticida vs el porcentaje del daño observado, que puede ser la mortalidad. El análisis probit permite transformar esa curva sigmoidea en una lineal a través de la cual se estima el valor de LC_{50} (ECOFRAM, 1999a).

Una o más ecuaciones dosis-respuesta (cada una definida por un valor específico de LC_{50} y su pendiente) se pueden utilizar para generar una o más distribuciones normales de sensibilidad (tolerancia) y así generar una probabilidad de riesgo (ECOFRAM, 1999a).

(3) Se realizan a través de modelos de simulación que permiten obtener cálculos probabilísticos de riesgo. Estos modelos permiten incorporar numerosas especies y así evaluar los efectos directos e indirectos sobre las mismas.

8.1.3. Niveles o “tiers” en el análisis de riesgo

ECOFRAM sugiere cuatro niveles a seguir en el proceso de la obtención del riesgo. Estos van alcanzando un mayor nivel de complejidad a través de la información y datos experimentales que se van incorporando al análisis.

El nivel de análisis que utilicemos para calcular el riesgo de un pesticida, dependerá del nivel de confianza que nos brinden los datos obtenidos a la hora de tomar decisiones.

Siguiendo a la USEPA (1992) y a ECOFRAM (1999a) el **nivel 1** (Figura 8.1) tiene los siguientes objetivos:

- Identificar aquellos pesticidas que implican un riesgo en el ambiente, para así obtener la mínima preocupación sobre el mismo (mínimo riesgo ecológico asociado a cuerpos de agua).
- Realizar el análisis utilizando tanto los patrones de uso de los pesticidas como los grupos más sensibles de animales y plantas (por ejemplo, invertebrados y peces y plantas acuáticas).
- Priorizar los patrones de uso del pesticida en relación a una potencial exposición en el ambiente.
- Proporcionar una evaluación del riesgo si las concentraciones agudas o crónicas son motivo de preocupación.
- Determinar la necesidad de considerar la toxicidad sobre los sedimentos.

Este nivel de análisis genera un cociente de riesgo sencillo utilizando datos de toxicidad aguda y crónica, para un ambiente simple y conservativo. Se incluyen 4 valores de toxicidad aguda y de 4 a 7 valores de toxicidad crónica para especies de agua dulce y 3 para especies marinas de importancia. En los valores de toxicidad crónica para especies de agua dulce se

incluyen 2 especies de peces, 1 especie de invertebrado y de 1 a 4 especies de algas. USEPA (2000) realiza otras recomendaciones a la hora de elegir que especies introducir en un análisis de riesgo para compuestos organofosforados, por ej. LC₅₀ de un invertebrado, un pez de agua cálida y uno de agua fría, y una o más especies de algas o macrófitas acuáticas. Si hay exposición en el estuario incorporar un pez estuarino, un artrópodo y un molusco.

El escenario de exposición es seleccionado por los organismos reguladores para representar un cierto grado de preocupación definido previamente. De tal manera que si este nivel 1 de análisis señala que no hay riesgo, esto es suficiente como nivel de protección.

El **nivel 2** (Figura 8.1) proporciona una evaluación probabilística del riesgo utilizando las relaciones de dosis-respuesta obtenidas a partir de los datos de toxicidad del nivel 1, combinado con la evaluación de la exposición del pesticida en agua a escala multi-regional.

En este nivel pueden incorporarse al modelo, análisis realizados a escala de laboratorio y campo, incorporando grupos de especies más sensibles que los considerados en el nivel 1 y así obtener un factor de seguridad menor. Esto se logra bajando los límites en las concentraciones ambientales permitidas.

Con un mayor número de especies puede determinarse la distribución de sensibilidad para las especies y estimar los percentiles 5° y 10° de la misma.

En relación al sedimento, pueden incorporarse al modelo valores de toxicidad en los mismos estimados a partir de bioensayos de laboratorio, o bien a través de los coeficientes de partición en el agua y sedimento.

Los objetivos del **nivel 2** son:

- Proporcionar expresiones de probabilidad para el riesgo combinado asociado a los patrones de uso y los taxones identificados en el nivel 1.
- Confirmar que el riesgo previsto en el Nivel 1 se aplica aún cuando los procesos físico-químicos y los parámetros ambientales en el destino están mejor representados.
- Proporcionar una estimación de la variación del riesgo temporal, regional y estacional en una amplia gama de condiciones propias del uso del producto.

- Permitir una evaluación preliminar de las opciones básicas de mitigación y gestión probando que este nivel de análisis es suficiente.
- Orientar acerca de que opciones del nivel 3 deben entrar en consideración.

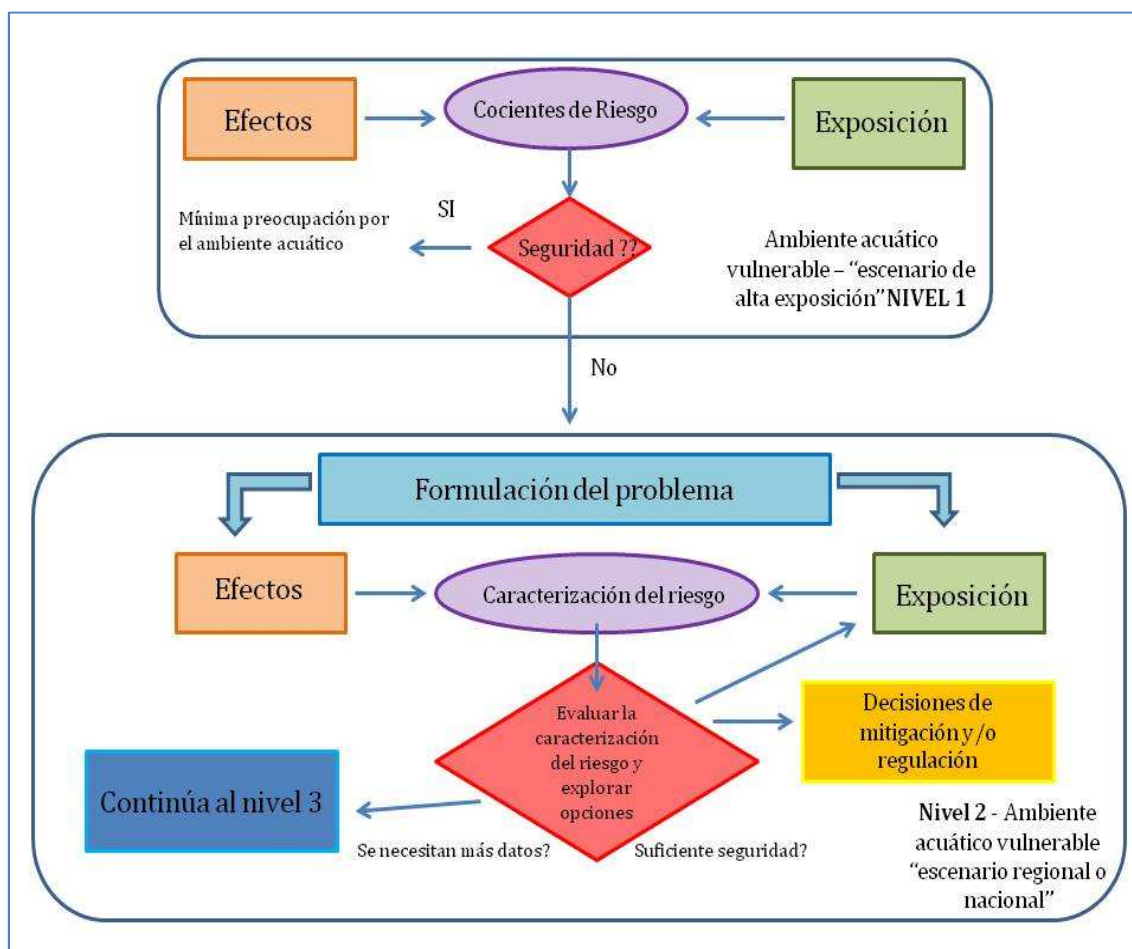


Figura 8.1. Niveles 1 y 2 en un análisis de riesgo. Elaboración propia con datos de ECOFRAM Aquatic Report (1999b).

El **nivel 3** (Figura 8.2) provee un análisis de riesgo más refinado al obtenido en el nivel 2, a través de la incorporación de nuevos datos derivados de estudios complementarios como: estudios de toxicidad aguda con un mayor número de especies, inclusión de especies autóctonas, estudios de toxicidad crónica, análisis de la toxicidad asociando su variación en el tiempo o en exposiciones repetidas, estudios de la toxicidad de los sedimentos, la inclusión de

escenarios más realistas usando modelos GIS u otros, estudios del destino ambiental de los tóxicos a nivel laboratorio o pseudo- campo.

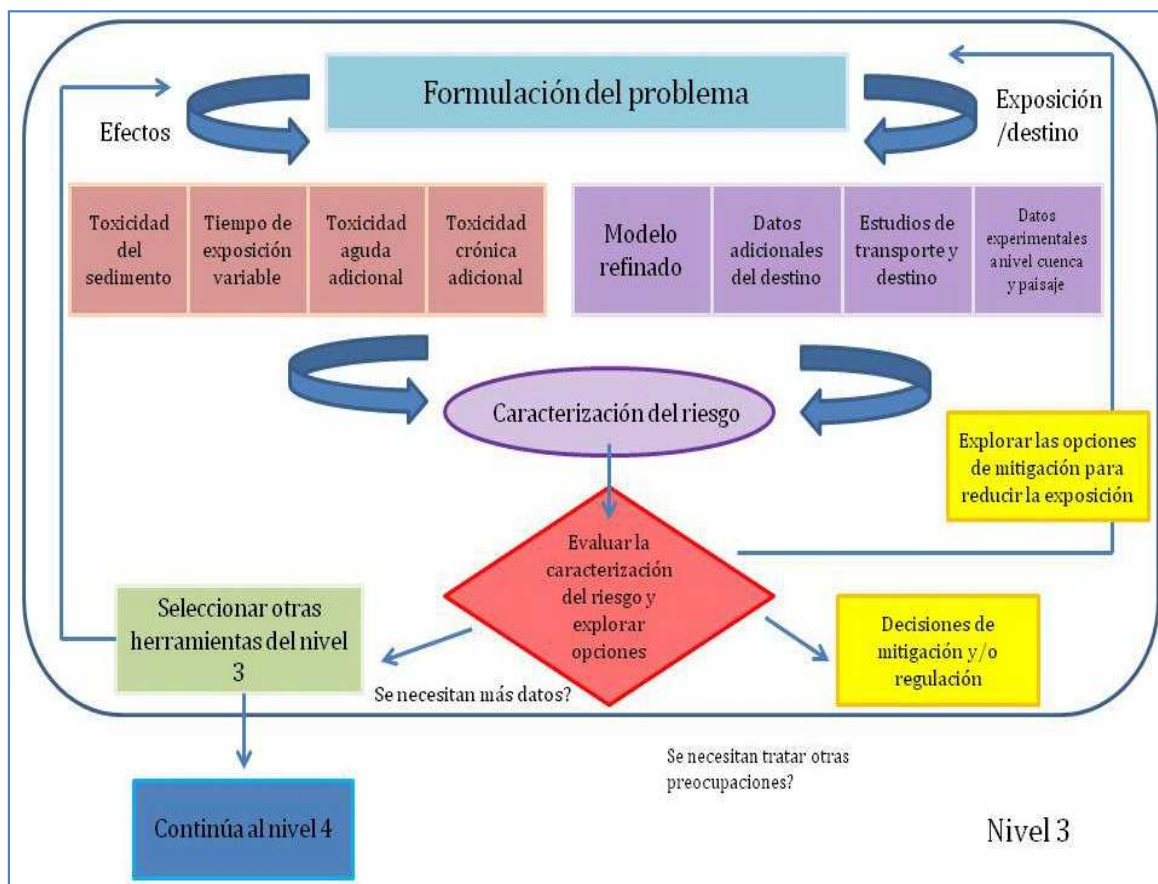


Figura 8.2. Nivel 3 en un análisis de riesgo. Elaboración propia con datos de ECOFRAM Aquatic Report (1999b).

El **nivel 4** (Figura 8.3) es el más sofisticado de todos los niveles debido a los programas que utiliza y a los estudios de validación que requiere. Permite caracterizar definitivamente los aspectos clave de los perfiles de toxicidad o exposición. Se incluyen: un monitoreo generalizado, una investigación más detallada de la eficacia de mitigación, evaluaciones de la cuencas más detalladas, modelos de referencia en relación con los datos químicos existentes, un modelado de la población o de la dinámica de los ecosistemas, estudios de microcosmos o mesocosmos.

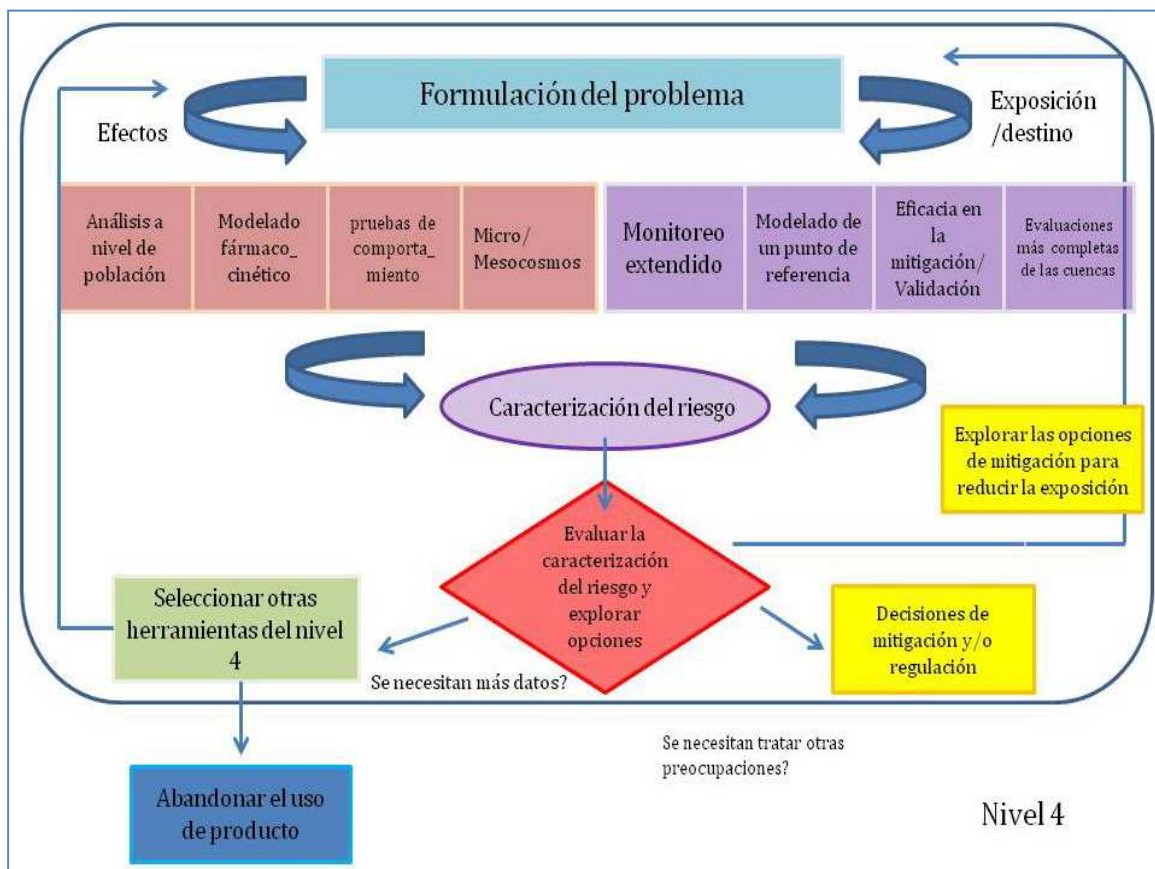


Figura 8.3. Nivel 4 en un análisis de riesgo. Elaboración propia con datos de ECOFRAM Aquatic Report (1999b).

8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

8.2.1. Evaluación de riesgo ecológico

Con el fin de evaluar el nivel de contaminación del insecticida clorpirifos en Claromecó y Tres Arroyos, las concentraciones máximas halladas en el agua fueron comparadas con datos ecotoxicológicos. La mayoría de los datos fueron obtenidos de la Red de Acción en Plaguicidas (PAN) Base de Datos de Pesticidas (www.pesticideinfo.org) y otros de literatura. Se utilizaron los valores de LC_{50} para los cálculos de riesgo agudo y NOEC (concentración sin efecto

observado) o LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto) para los de riesgo crónico (efectos reproductivos, de desarrollo o de efectos letales).

El análisis de riesgo se realizó utilizando un método semi-cuantitativo (8.2.1.1) y dos probabilísticos (8.2.1.2.1 y 8.2.1.2.2) con el fin de ser comparados en este análisis. La transformación realizada de los datos se explica en dichas secciones y siguen las sugerencias de ECOFRAM (1999a).

Dado que son escasos los estudios toxicológicos con clorpirifos para especies típicas de nuestra zona de estudio, en el análisis de riesgo se incluyeron órdenes, géneros o especies de Argentina que podrían verse afectadas por la contaminación con este pesticida. Ellas son: Odonata, *Hyallela sp.*, *Chironomus sp.*, *Ceriodaphnia sp.*, *Daphnia sp.*, *Callinectes sapidus*, *Gammarus sp.*, *Palaemon sp.*, *Palaemonetes sp.*, *Neomysis sp.*, *Poecilia sp.*, *Biomphalaria sp.*, *Artemia sp.*, *Notonecta sp.*, *Mugil sp.*, *Rana sp.*, *Hyla sp.*, *Hydra sp.*, *Ciona intestinalis*, *Bufo sp.*, *Lymnaea sp.*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens quinquefasciatus*, *Cyprinus carpio*, *Mytilus sp.*, *Rhinella arenarum* y *Gambusia affinis*. Especies como la *Tilapia sp.* o *Oncorhynchus mykiss* que se crían o cultivan en nuestro país como especies destinadas al consumo o pesca deportiva (Lopez *et al.*, 1987).

También se consideraron algunas especies muy utilizadas mundialmente en estudios toxicológicos con este insecticida y que no son habitantes típicos de nuestro país. Estas son: *Morone saxatilis*, *Lepomis macrochirus* (bluegill sunfish), *Pteronarcys californica* (stonefly), *Pimephales promelas*, *Cyprinodon variegatus*, *Anguilla anguilla*, *Pungitius pungitius*, *Mysidopsis bahia*, *Eriocheir sinensis*, *Paratya australiensis*, *Xenopus laevis*, *Menidia menidia* y *Caenorhabditis elegans*.

8.2.1.1. Método semi-cuantitativo

El riesgo calculado a partir del método del cociente (RQ) ha sido desarrollado en un esfuerzo por cuantificar el riesgo de exposición de las especies a productos químicos existentes en el entorno natural que las rodea. Este método es considerado semi-cuantitativo, como se dijo anteriormente, y pertenecería al nivel 1 en las evaluaciones de riesgo (Ver 8.1.3), ya que utiliza suposiciones simples y relativamente conservadoras. El resultado del cociente

RQ nos permitirá comparar el valor obtenido con ciertos niveles establecidos de preocupación como un nivel de protección, y así comprobar si representa o no un riesgo para el ambiente.

El cociente se calcula para cada pesticida i y para ello se divide la concentración C_i medida en el campo (exposición), con los valores de referencia del tóxico para cada especie (Ecuación 3).

$$RQ_i = \frac{\text{Exposición}}{\text{Toxicidad}} = \frac{C_i}{LC_{50} \text{ o } EC_{50}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Para realizar este análisis se incluyeron solo aquellas especies de las tablas 8.3 y 8.4 que pertenecen a la Argentina o bien que poseen el mismo género que las mismas. Se calcularon los cocientes RQ agudo y crónico para la concentración máxima y el RQ agudo para la concentración mínima de clorpirifos hallada en las cuatro campañas realizadas.

Los cocientes de riesgo fueron calculados dividiendo la concentración máxima y mínima de clorpirifos registrada en el campo por los valores de LC_{50} , NOEC o LOEC de especies o géneros que poseen representantes en Argentina (Ecuación 3). Los niveles de preocupación que recomienda la USEPA para compuestos organofosforados son de $RQ \geq 0,5$ para riesgo agudo alto y $RQ \geq 1$ para riesgo crónico alto. En el caso de calcularse el riesgo agudo, con los LC_{50} , puede utilizarse el nivel de preocupación de 0,1 para uso restringido del producto (USEPA, 2002).

8.2.1.2. Métodos cuantitativos

8.2.1.2.1. Distribución de la sensibilidad

La distribución de la sensibilidad de las especies es un procedimiento ampliamente utilizado no solo como una herramienta para evaluar el riesgo ecológico de determinados tóxicos (Solomon *et al.*, 1996), sino también para la formulación de los parámetros de calidad

de agua (ANZECC y ARMCANZ, 2000). Esto se debe a que cuando se usa correctamente puede introducir una confianza mayor en la evaluación de riesgos, en comparación con el cociente tradicional (RQ) que no aplica ninguna herramienta estadística.

El objetivo de un análisis de distribución de sensibilidad es determinar una concentración de protección para la mayoría de las especies del entorno. Por lo general, se utiliza una estimación puntual conocida como la concentración peligrosa para el 5% de las especies, que equivaldría a proteger al 95% de las mismas, en cualquier estudio de riesgo (Van Straalen y Van Rijn, 1998; Wheeler *et al.*, 2002).

En nuestro análisis hemos incorporado los percentiles 5° y 10° que afectarían negativamente al 5 y al 10% de las especies consideradas por la concentración máxima y mínima de clorpirifos en agua obtenida a campo.

De acuerdo a lo explicado en las secciones 8.1.2 y 8.1.3, nuestro análisis de riesgo pertenecería a un nivel 2-3, debido a que se tuvieron en cuenta las realidades locales de la aplicación, y los niveles ambientales medidos. Se incorporaron elementos de los niveles 1 (valores de concentración de aplicación del producto), 2 (valores obtenidos a campo) y 3 (transferencia de clorpirifos desde los sedimentos al agua, considerando además variaciones temporales y espaciales de los usos y aplicaciones de este pesticida).

Las concentraciones de clorpirifos medidas a campo se compararon con los valores bibliográficos de toxicidad aguda y crónica incorporando un importante número de especies y taxones. Con este segundo nivel de análisis (Tier 2) concluimos que los niveles guía sugeridos por organizaciones nacionales e internacionales eran ampliamente superados.

Las especies se ordenaron por sus LC_{50} con un número de rango desde las más sensibles a las menos sensibles, siendo las más sensibles las de menor número. Luego el rango se transformó a valores percentiles: $[i / (n + 1)]$, que serían las probabilidades acumuladas, donde i es el rango de especie, y n es el número total de especies enumeradas (Solomon *et al.*, 1996; ECOFRAM, 1999a; Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005).

Se realizaron regresiones probit para riesgo agudo y crónico. El cálculo probit devuelve el inverso de la distribución normal estándar acumulativa de los percentiles (y) y se grafica en función de $\log LC_{50}$ o $\log NOEC$ o $\log LOEC$ (x). Así se obtienen las rectas de regresión con sus respectivas ecuaciones.

El modelo Log-normal da como resultado una ecuación de tipo $Y = aX + b$, donde “Y” es el percentil de la escala probit, “a” la pendiente y “b” la ordenada (Solomon *et al.*, 1996). La distribución de sensibilidad, ya sea mediante una transformación log normal o log logística, se estabiliza con 10-15 valores, sugiriendo que con un mínimo de 10 valores el resultado obtenido es confiable como herramienta de toma de decisiones (Wheeler *et al.*, 2002).

8.2.1.2.2. Probabilidad de excedencia

Las curvas de probabilidad conjunta (“Joint probability”) se construyeron combinando por un lado las curvas de riesgo agudo (LC_{50}) y crónico (LOEC o NOEC para efectos crónicos reproductivos, de desarrollo o de efectos letales), y por el otro la curva de probabilidad de excedencia de concentraciones ambientales, construida a partir de los niveles guía y las concentraciones de clorpirifos en agua y su transferencia desde los sedimentos. Estas curvas describen la probabilidad de que una dada concentración ambiental sea superior a un determinado nivel que resultará en un efecto biológico negativo, tal como la mortalidad o la alteración de la reproducción, en un determinado escenario. Para los propósitos de mitigación, el resultado final será obtener el porcentaje de especies afectadas y los valores límite de riesgo a sugerir para el clorpirifos (USEPA, 2000).

A partir de las curvas de probabilidad conjunta se estimaron por un lado las probabilidades de excedencia de las concentraciones de clorpirifos por sobre los valores sugeridos como criterios de calidad de agua de Canadá (CCME, 1999), la Unión Europea (EU, 2001) y la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina (2005). También se estimaron las probabilidades de excedencia de concentraciones críticas de clorpirifos para los percentiles 5 y 10 de especies afectadas, tanto en forma aguda como crónica.

8.3. RESULTADOS

8.3.1. Evaluación de riesgo ecológico

8.3.1.1. Métodos semi-cuantitativo

Para un total de 40 especies analizadas, los valores calculados de RQ para la concentración máxima ($Co_{m\acute{a}x}$) de clorpirifos en agua, variaron de 0,0002 a 79,55, y los correspondientes a la concentración mínima ($Co_{m\acute{i}n}$) de $9,03 \cdot 10^{-07}$ a 0,35 (Figura 8.4 y Figura 8.5).

Por otro lado, el rango de RQ crónico para la concentración máxima de $2,78 \mu\text{g/l}$ estuvo entre 0,0003 y 6960 (Figura 8.6).

Para la $Co_{m\acute{a}x}$ de clorpirifos en agua un 43% de las especies presentó un riesgo agudo alto ($\geq 0,5$) y un 50% un riesgo crónico alto (≥ 1). En un 68% de las veces se superó el valor de 0,1 para el riesgo agudo, que sugiere el uso restringido del producto para la protección de dichas especies

Para la $Co_{m\acute{i}n}$ de $0,012 \mu\text{g/l}$, un 10% presentó un riesgo mayor a 0,1. Estas especies fueron: *Mysidopsis bahía*, *Daphnia magna*, *Hyalella azteca* y *Ceriodaphnia dubia*. (Figura 8.5).

Las especies que serían más afectadas por la $Co_{m\acute{a}x}$ de clorpirifos de $2,78 \mu\text{g/l}$, tanto a nivel agudo como crónico, fueron los cladóceros, los anfípodos, los camarones, los gamáridos, los insectos, algunas especies de anfibios y peces (Figuras 8.4 y 8.6).

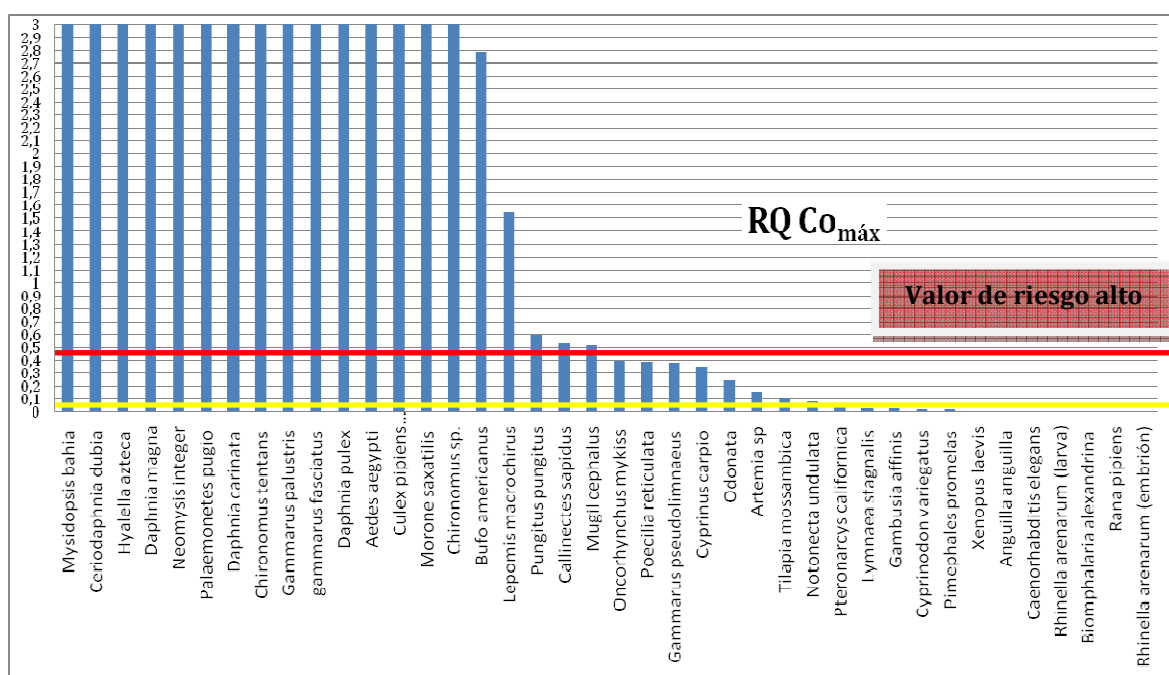


Figura 8.4. Se observan los valores de *RQ agudos* para la concentración máxima de clorpirifos ($2,78 \mu\text{g/l}$) hallada en la localidad de Tres Arroyos. Las especies que presentan valores por

encima de la línea roja muestran un riesgo alto al insecticida. La línea amarilla muestra el valor de RQ a partir del cual debería de considerarse un uso restringido del producto.

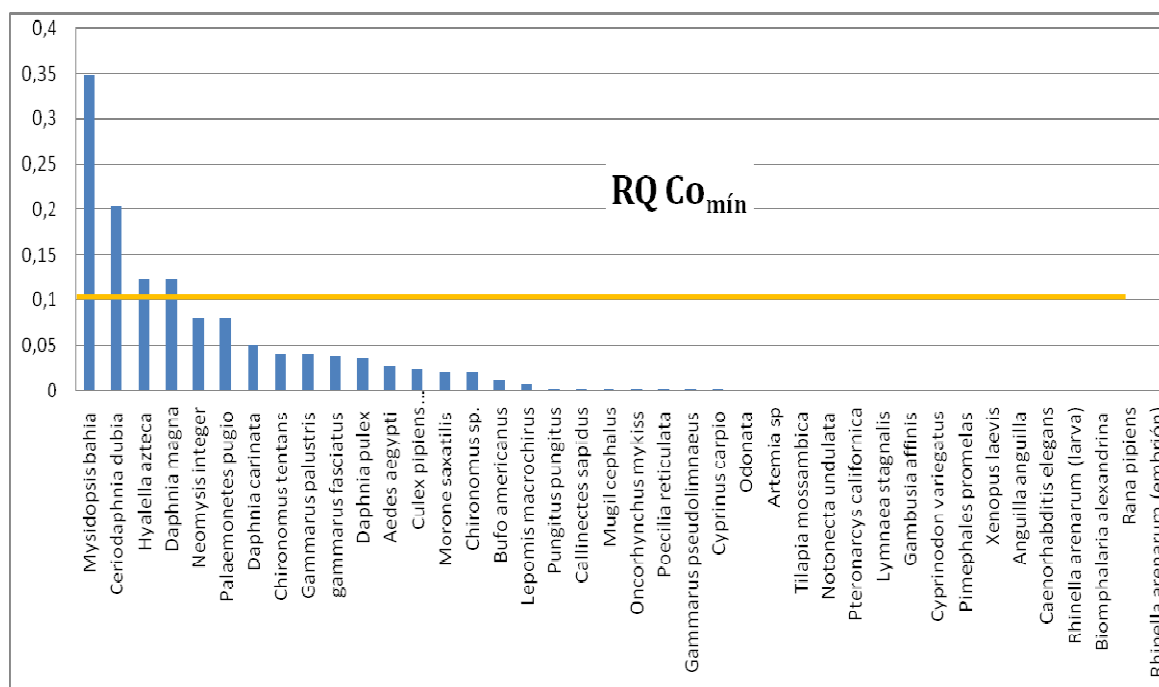


Figura 8.5. Se observan los valores de *RQ agudos* para la concentración mínima de clorpirifos (0,012 µg/l) hallada en la localidad de Tres Arroyos. La línea amarilla muestra el valor de RQ a partir del cual debería de considerarse un uso restringido del producto.

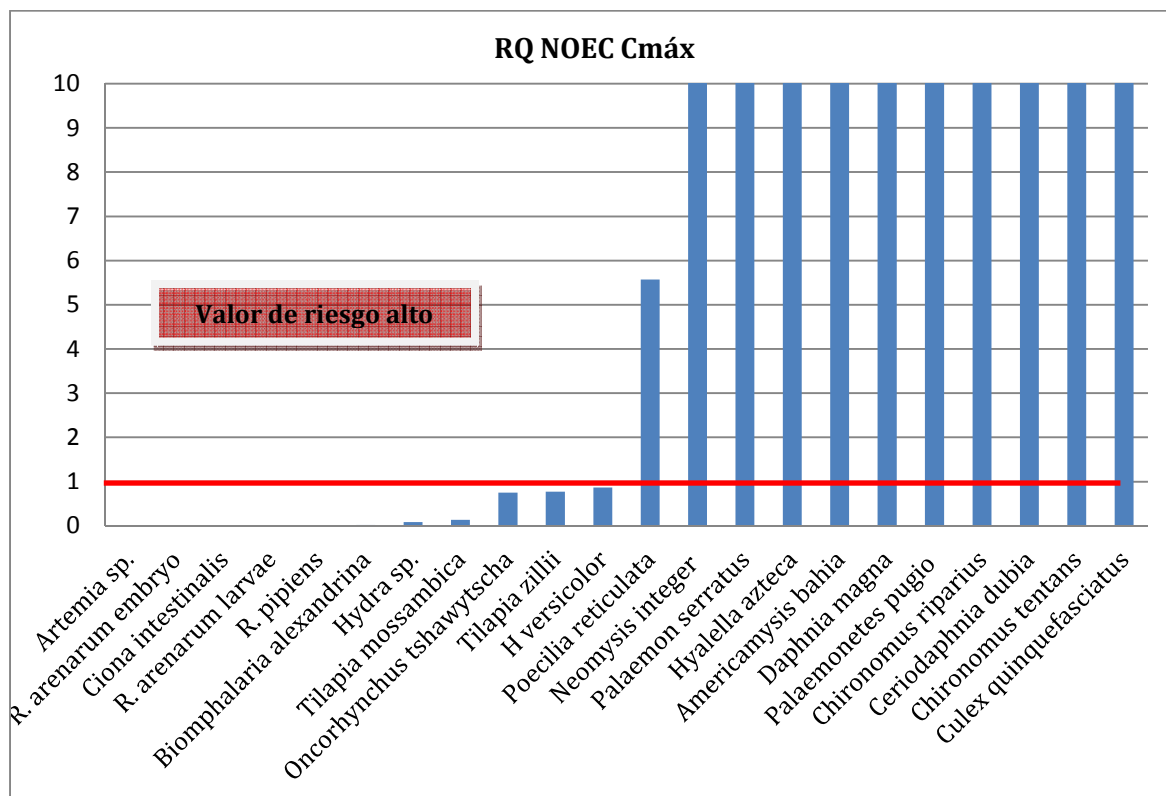


Figura 8.6. Se observan los valores de *RQ* crónicos para la concentración máxima de clorpirifos (2,78 µg/l) hallada en la localidad de Tres Arroyos, para aquellos grupos taxonómicos que poseen representantes en Argentina. La línea roja representa un riesgo alto para las especies analizadas.

8.3.1.2. Estudios cuantitativos

El análisis probit obtenido para riesgo agudo (Figura 8.7) mostró como resultado que la concentración máxima obtenida de clorpirifos en agua (2,78 µg/l) estaría afectando a un 38% de las especies, mientras que la concentración mínima (0,012 µg/l) a un 5% de las mismas.

Los percentiles 5° y 10° obtenidos como parámetros de riesgo de la regresión probit dieron concentraciones de 0,014 y 0,059 µg/l, indicando que a estas concentraciones los daños agudos se presentarían en el 5 y 10% de las especies analizadas, (tabla 8.1) debido a que poseen valores de LC_{50} menores a esas concentraciones.

En el caso del riesgo crónico (Figura 8.8) el análisis probit mostró que la concentración máxima de clorpirifos en agua estaría afectando a un 53% de las especies, y que la mínima a un 16%. Los percentiles 5° y 10° dieron concentraciones de 0,0005 y 0,0031 $\mu\text{g/l}$ respectivamente (Tabla 8.1).

Los porcentajes de especies afectadas para ambas concentraciones de clorpirifos, fueron mayores a nivel crónico que a nivel agudo.

Tabla 8.1. Resumen de la información obtenida a partir de las Figuras 8.7 y 8.8 de los análisis probit vs log LC_{50} . Referencias: sp=especies; $\text{Co}_{\text{máx}}$: concentración máxima; $\text{Co}_{\text{mín}}$: concentración mínima.

	5° percentil ($\mu\text{g/l}$)	10° percentil ($\mu\text{g/l}$)	% sp afectadas a la $\text{Co}_{\text{máx}}$	% de especies afectadas a la $\text{Co}_{\text{mín}}$
Riesgo agudo	0,014	0,059	38%	5%
Riesgo crónico	0,0005	0,0031	53%	16%

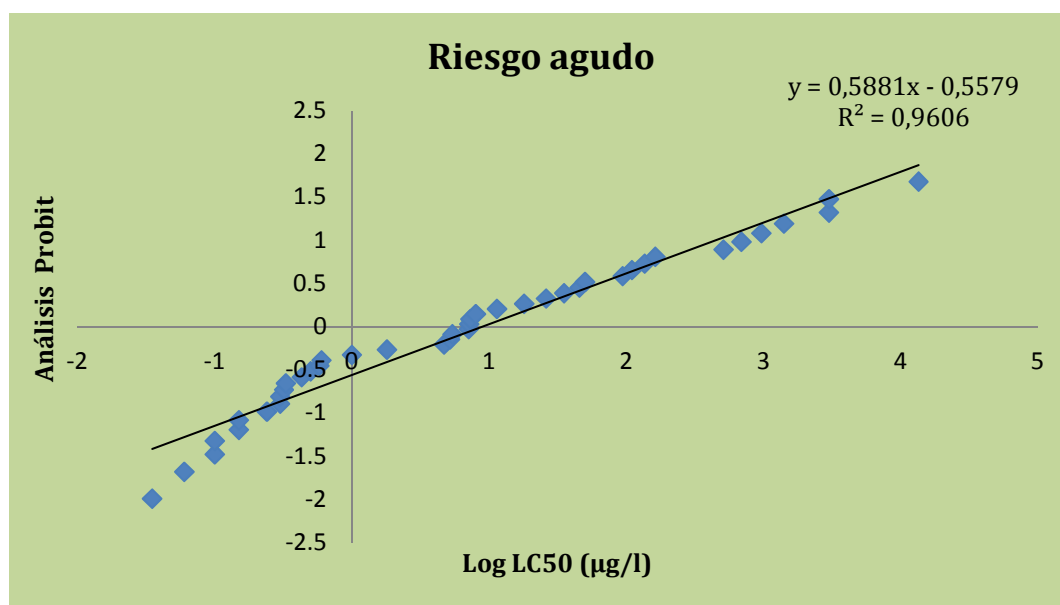


Figura 8.7. Distribución de los valores agudos de toxicidad para la exposición de clorpirifos a diferentes grupos taxonómicos. Los valores letales LC_{50} fueron ordenados en forma

decreciente de sensibilidad y el orden transformado a percentiles ($i/(n+1)$). La regresión probit se aplicó para determinar los percentiles 5° y 10°.

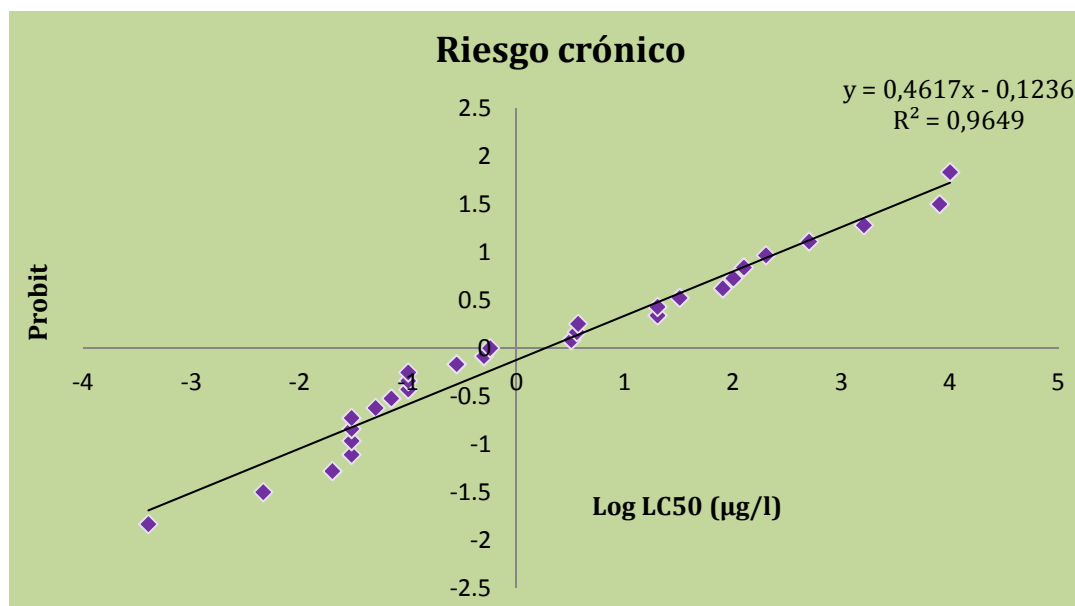


Figura 8.8. Distribución de los valores crónicos de toxicidad para la exposición de clorpirifos a diferentes grupos taxonómicos. Los valores letales LC_{50} fueron ordenados en forma decreciente de sensibilidad y el orden transformado a percentiles ($i/(n+1)$). La regresión probit se aplicó para determinar los percentiles 5° y 10°.

El análisis de probabilidad de excedencia dejó en evidencia que los valores de referencia sugeridos por la Subsecretaría de Recursos hídricos de la Nación Argentina, la Unión Europea y el Canadá, fueron superados en porcentajes que varían de 75 a 92%. La Figura 8.9 indica para cada concentración de clorpirifos en el eje x, la frecuencia en la que esa concentración fue excedida en el período analizado y el porcentaje de especies afectadas (Tabla 8.2).

Cómo se mencionó anteriormente, los percentiles 5° y 10° son los valores de concentración de clorpirifos que protegerían al 95 y 90% de las especies de algún efecto adverso agudo o crónico. En relación a los valores ambientales de clorpirifos obtenidos a campo de Tres Arroyos y Claromecó, los porcentajes en los cuáles se superan estas concentraciones son de 62% y 39% para los percentiles 5° y 10°, en el de caso de riesgo agudo.

Para el riesgo crónico los porcentajes correspondientes a los percentiles 5° y 10° fueron de 96 y 83% (Tabla 8.2).

Tabla 8.2. Resumen de los valores obtenidos a partir de la Figura 8.9 del análisis de Probabilidad conjunta.

Valores de referencia para la protección de la biota acuática	Concentración de CPF (ug/l)	Probabilidad de excedencia
Nivel guía Nacional - Subsecretaría de Recursos hídricos de la Nación (Agua sin filtrar) (2005)	0,006	75%
Unión Europea - 91/414/EEC (2001)	0,001	92%
Canadá - Canadian environm. quality guidelines- CCME (1999)	0,0035	82%
<i>Datos ambientales de concentración de clorpirifos de Tres Arroyos y Claromecó</i>	<i>Percentiles</i>	<i>Probabilidad de excedencia</i>
Riesgo agudo	5°	62%
	10°	39%
Riesgo crónico	5°	96%
	10°	83%

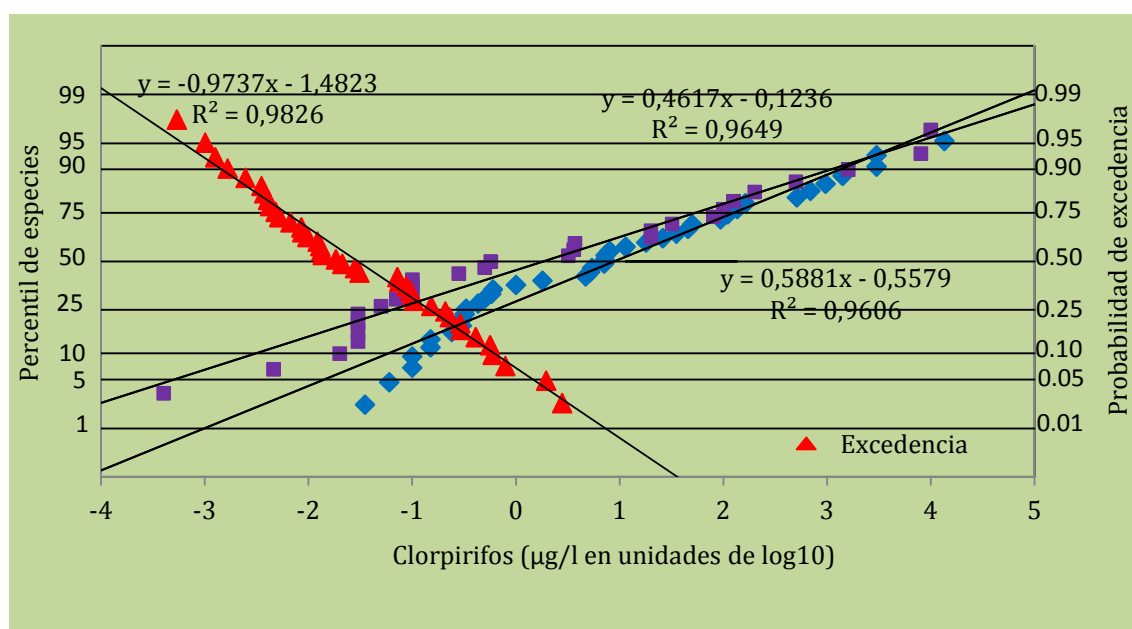


Figura 8.9 Distribución de probabilidad conjunta para el análisis de riesgo de excedencia.

Tabla 8.3. Valores utilizados en el análisis de riesgo agudo y de probabilidad conjunta.

<i>Especies</i>	<i>Toxicidad</i>	<i>Efecto</i>	<i>Clorpirifos (µg/l)</i>
Crustáceos			
Cladoceros			
<i>Daphnia magna</i>	48h-LC50	Mortalidad	0,1
<i>Daphnia carinata</i>	48h-LC50	Mortalidad	0,24
<i>Daphnia pulex</i>	48h-LC50	Mortalidad	0,33
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	48h-LC50	Mortalidad	0,06
Camarones			
<i>Neomysis integer</i>	96h-LC50	Mortalidad	0,15
<i>Artemia SP</i>	24h-LC 50	Mortalidad	18
<i>Palaemonetes pugio</i>	96h-LC50	Mortalidad	0,15
<i>Mysidopsis bahia</i> ⁽⁰⁾	LC50	Mortalidad	0,035
Anfipodos			
<i>Hyalella azteca</i> ⁽¹⁾	48h- LC50	Mortalidad	0,1
<i>Gammarus palustris</i>	96h-LC50	Mortalidad	0,30
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	48h- LC50	Mortalidad	7,29
<i>Gammarus fasciatus</i>	96h-LC50	Mortalidad	0,32
Cangrejos			
<i>Callinectes sapidus</i> ⁽²⁾	48h-LC50	No hay datos	5,2
<i>Trichodactylus borellianus</i> ⁽³⁾	96h-LC50	Desarrollo	45,53
Insectos			
<i>Chironomus sp.</i>	24h-LC50	Mortalidad	0,60
<i>Chironomus tentans</i> ⁽¹⁾	48h-LC50	Mortalidad	0,3
<i>Aedes aegypti</i>	24h-LC50	Mortalidad	0,43
Odonata	24h-LC50	Mortalidad	11,4
<i>C. p. Quinquefasciata</i>	24h-LC50	Mortalidad	0,50
<i>Notonecta undulata</i>	24 h-LC50	Mortalidad	35,2
<i>Pteronarcys californica</i>	LC50	No hay datos	50
Moluscos			

<i>Biomphalaria alexandrina</i>	24h-LC50	Mortalidad	3000
<i>Lymnaea stagnalis</i>	96h-LC50	Mortalidad	> 94
Peces			
<i>Morone saxatilis</i>	96h-LC50	Mortalidad	0,58
<i>Oncorhynchus mykiss</i> ⁽³⁾	96h-LC50	Mortalidad	7,1
<i>Cyprinus carpio</i>	96h-LC50	Mortalidad	8
<i>Gambusia affinis</i>	24h-LC50	Mortalidad	110
<i>Poecilia reticulata</i>	96h-LC50	Mortalidad	7,17
<i>Tilapia mossambica</i>	96h-LC50	Mortalidad	26
<i>Lepomis macrochirus</i> ⁽⁴⁾	LC50	No hay datos	1,8
<i>Pimephales promelas</i> ⁽¹⁾	48h-LC50	Mortalidad	162,7
<i>Pungitius pungitius</i> ⁽⁵⁾	48h-LC50	Mortalidad	4,7
<i>Anguilla Anguilla</i>	48h-LC50	Mortalidad	690
<i>Cyprinodon variegatus</i>	96h-LC50	Mortalidad	136
<i>Mugil cephalus</i> ⁽⁴⁾	96h-LC5	No hay datos	5,4
Anfibios			
<i>Rinella arenarum</i> (embrión)⁽⁶⁾	144h-LC50	Mortalidad	13500
<i>Rhinella arenarum</i> (larva)⁽⁷⁾	96h-LC50	Mortalidad	1410
<i>Xenopus laevis</i> ⁽⁸⁾	96h -LC50	No hay datos	511
<i>Rana pipiens</i> ⁽⁴⁾	24h-LC50	Toxicidad demostrada	3000
<i>Bufo americanus</i> ⁽⁴⁾	24h-LC50	Toxicidad demostrada	1
Nematodos			
<i>Caenorhabditis elegans</i>	24h-LC50	No hay datos	966

Fuentes: <http://www.pesticideinfo.org/>; ECOTOX database

(0) USEPA (1986); USEPA (2002)

(1) Moore *et al* (1998)

(3) Mayer (1986)

(2)USEPA (2003)

(3) Montagna (2010)

(4) USEPA (1999)

(5) Munn y Gilliom (2001)

(6) Sotomayor *et al.* (2012)

(7) Liendro *et al.* (2011)

(8) CCME (2008)

Tabla 8.4. Valores utilizados en el análisis de riesgo crónico y de probabilidad conjunta. Referencias: NOEC (No Observed Effect Concentration), LOEC (Low Observed Effect Concentration), LOAEL (Lowest Observable Adverse Effects Level), NOAEL (No Observable Adverse Effects Level).

<i>Especies</i>	<i>Toxicidad</i>	<i>Efecto</i>	<i>Clorpirifos (µg/l)</i>
Cladóceros			
<i>Daphnia magna</i>	NOEC	Mortalidad	0,03
Camarones			
<i>Artemia SP</i>	NOEC	Mortalidad	10000
<i>Palaemonetes pugio</i>	LOEC	Mortalidad	0,03
<i>Mysidopsis bahia</i>	LOAEL LOEC	Reproducción Mortalidad	0,0046 0,05
<i>Paratya australiensis</i>	NOAEL	Mortalidad	0,07
<i>Palaemon serratus</i>	NOAEL	Mortalidad	0,1
<i>Neomysis integer</i>	NOEC	Crecimiento	0,1
Anfípodos			
<i>Hyalella azteca</i>	LOEC	Mortalidad	0,1
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	NOEC	Mortalidad	0,03
Cangrejos			
<i>Eriocheir sinensis</i>	NOAEL	Eclosión	100
Insectos			
<i>Chironomus tentans</i>	NOAEL	Desarrollo	0,02
<i>Chironomus riparius</i>	NOEC	Mortalidad	0,03
<i>C. p. Quinquefasciata</i>	LOAEL	Desarrollo	0,0004
Moluscos			
<i>Biomphalaria alexandrina</i>	NOEC	Mortalidad	125
Peces			
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	NOAEL	Mortalidad	3,7
<i>Poecilia reticulata</i>	NOEC	Desarrollo	0,5
<i>Tilapia mossambica</i>	NOEC	Desarrollo	20
<i>Tilapia zillii</i>	NOEC	Mortalidad	3,6
<i>Pimephales promelas</i>	NOAEL	Reproducción	0,57
<i>Menidia menidia</i>	NOAEL	Reproducción	0,28
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	LOEC	Desarrollo	80
Anfibios			
<i>Rhinella arenarum</i> (larva) ⁽¹⁾	NOAEL	Teratogénico	500
<i>Rinella arenarum</i> (embrión) ⁽²⁾	NOAEL	Teratogénico	8000
<i>Xenopus laevis</i>	NOEC	Mortalidad	20
<i>Rana pipiens</i>	NOEC	Des-Mort	200

<i>Hylla versicolor</i>	NOEC	Crecimiento	3,2
Cnidarios			
<i>Hydra sp.</i>	NOAEL	Mortalidad	32
Tunicados			
<i>Ciona intestinalis</i>	NOEC	Desarrollo	1600

Fuentes: <http://www.pesticideinfo.org/>; ECOTOX database

(1) Sotomayor *et al.* (2012)

(2) Liendro *et al.* (2011)

8.4. DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que las concentraciones registradas de clorpirifos en las aguas de Tres Arroyos y Claromecó generarían tanto riesgo agudo como crónico, aún a la concentración más baja de 0,012 µg/l en la cual se afectaría a un 5% y 16% de las especies incluidas en este estudio (Tabla 8.1). En Argentina el único valor existente como criterio de calidad de agua para la biota acuática para el clorpirifos, considerando agua dulce sin filtrar, es el estimado por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación que data del año 2005 y cuyo valor es de 0,006 µg/l. Para realizar dicho cálculo utilizaron 12 valores de LC₅₀ de los siguientes géneros: *Ceriodaphnia*, *Hyalella*, *Gammarus*, *Chironomus*, *Daphnia*, *Cloeon*, *Asellus*, *Oncorhynchus*, *Procambarus*, *Salvelinus*, *Pimephales* e *Ictalurus*. Nuestro análisis incluyó a 51 géneros diferentes e incorporó un mayor número de vertebrados e invertebrados representativos de Argentina. El 100% de las muestras de agua analizadas en esta tesis han superado el valor de 0,006 µg/l, y de acuerdo a nuestra curva de regresión probit éste superaría en doce veces el valor de 0,0005 µg/l que protegería al 95% de las especies consideradas para el riesgo crónico que ha sido calculado en este análisis. Considerando las probabilidades de excedencia (incluyendo desorciones desde los sedimentos) se obtiene un 96% de superación de los valores para ese valor de percentil 5° de riesgo crónico.

Si bien los análisis semi-cuantitativos no explican lo que sucede con aquellas especies que superan varias veces el valor de RQ sugerido por la USEPA, y solo considera una aplicación del producto en un momento determinado, nos da una idea de cuáles serían las especies más sensibles al clorpirifos, y qué cambios podrían estar produciéndose en los ecosistemas acuáticos cuando éstas se hallan expuestas a éste y otros compuestos. Si bien este tipo de análisis sigue siendo utilizado y sugerido por organismos internacionales como la

USEPA (USEPA, 2002), la distribución probabilística de la sensibilidad de las especies es el procedimiento más acertado para evaluar el riesgo sobre las poblaciones animales en nuestra zona de estudio. Este método de análisis de riesgo ha demostrado ser una herramienta de evaluación útil y relativamente sencilla de aplicar (Albariño *et al.*, 2007; Venturino *et al.*, 2007; Anguiano *et al.*, 2012). En nuestro caso hemos incorporado una gran cantidad de especies de macroinvertebrados debido a que son ubicuos y propensos a verse afectados por diferentes perturbaciones humanas; su gran número de especies exhibe un rango de respuestas al estrés ambiental; su naturaleza sedentaria, en relación con otros organismos tales como peces, permite la determinación de la extensión espacial de la perturbación. Por otra parte, son ecológicamente relevantes, ya que representan el vínculo trófico entre la base (es decir, los productores primarios y el detritus) y la parte superior de las redes tróficas (peces, anfibios y aves), además de que son importantes en diferentes procesos del ecosistema (De Paggi, 1997).

Como se mencionó anteriormente, las especies que serían más susceptibles a la concentración máxima de clorpirifos (2,78 µg/l) considerando los LC50 corresponderían a los cladóceros, los anfípodos, los camarones, los gamáridos, los insectos, algunas especies de anfibios y peces. Al considerar las toxicidades crónicas solo se afectarían las especies de cladóceros, anfípodos, camarones, insectos y la especie de pez *poecilia reticulata* a la máxima concentración de clorpirifos. Estos resultados serían coincidentes con los publicados por otros autores (Qu *et al.*, 2011; Anguiano *et al.*, 2012), que indican que estos grupos de especies son los más afectados por compuestos organofosforados, y que concentraciones menores o iguales a 0,5 µg/l producen una reducción significativa en la abundancia, movilidad y supervivencia de algunas especies de macroinvertebrados como insectos *Cloeon dipterum* y *Caenis horaria*, crustáceos *Simocephalus vetulus* y *Gammarus pulex* y el molusco *Asellus aquaticus* (Van Wijngaarden *et al.*, 1996; Turner, 2003). Existen evidencias en mesocosmos con clorpirifos que demuestran que concentraciones mayores a 1-2 µg/l generan un impacto sobre las comunidades zooplánctónicas (Simon *et al.*, 1995).

Los estudios realizados por otros autores (Jergentz *et al.*, 2004, 2005; Mugni *et al.*, 2011, 2012) en la provincia de Buenos Aires, sugieren que las concentraciones encontradas en esta tesis en las localidades de Tres Arroyos y Claromecó, podrían generar un daño irreversible en los ecosistemas acuáticos de la zona. Jergentz *et al.* (2004) registraron valores de clorpirifos en agua de 0,3 µg/l y de 64 µg/kg en sedimento del arroyo Horqueta. La concentración hallada

en el sedimento significó un 100% de mortalidad de *H. curvispina*. Nuestros resultados de concentración los excedieron en un 40%, tanto para las muestras de agua como de sedimento. El mismo autor en el año 2005 encontró concentraciones de este insecticida en agua y sedimento en el arroyo Brown de 0,45 µg/l y 30,3 µg/kg. En nuestro caso, esos valores fueron sobrepasados en un 25% en el caso del agua y un 50% en el caso del sedimento. Una situación similar se observó al comparar con resultados de Mugni *et al.* (2011), en la cual estudiaron la supervivencia de *H. curvispina* y observaron mortalidades de un 30% cuándo las concentraciones de clorpirifos en agua fueron de 0,044 µg/L y de 12 µg/kg en los sedimentos. En nuestra zona de estudio se superaron ambos valores de concentración en un 85% de las veces. Para la misma especie se halló un 100% de mortalidad luego de 19 días de una aplicación de clorpirifos en campos circundantes, en la que se detectó una concentración de 0,06 µg/L. Para la especie de pez *C. decemmaculatus* se observó un 47% de mortalidad luego de la misma aplicación cuando la concentración de este insecticida en agua había disminuido a 0,35 µg/L. En nuestro caso, los resultados de concentración de clorpirifos de estos autores fueron superados en un 30% y 85% de las veces (Mugni *et al.*, 2012).

De Paggi (1997) afirmó que concentraciones muy pequeñas de clorpirifos pueden provocar cambios importantes en la estructura del zooplancton, lo que a su vez puede afectar a los niveles tróficos superiores e inferiores. La desaparición de estos recicladores de materia orgánica puede ocasionar un incremento del fitoplancton. Por otro lado, los peces planctívoros que se alimentan del macrozooplancton también pueden verse afectados al disminuir su recurso alimenticio.

8.5. CONCLUSIONES

Si bien este estudio es un análisis preliminar del riesgo que el clorpirifos podría estar generando en el ambiente, estos resultados muestran posibles efectos adversos para la supervivencia de la biota acuática.

A nuestro entender, es crucial analizar en qué proporción estaría afectando este insecticida a las diferentes comunidades que allí habitan y determinar así cuál sería la concentración máxima tolerable por las mismas para no ver amenazada su supervivencia. Para ello, es necesario implementar prácticas de manejo y control adecuadas, a la hora de

aplicar este compuesto en los campos cultivados. Su mal uso podría estar generando un daño irreversible sobre los arroyos superficiales y la fauna existente en los mismos.

El haber incorporado los análisis de riesgos semi-cuantitativos y cuantitativos, permitió obtener una visión global y completa acerca de qué especies fueron las más afectadas y en que proporciones, dependiendo de los valores ambientales del clorpirifos.

Entender el comportamiento de este insecticida permitirá establecer políticas específicas de conservación para proteger a un mayor número de especies sin que las cadenas tróficas se vean alteradas, lo que ocasionaría la pérdida irreparable de organismos cruciales para el buen funcionamiento de los ecosistemas acuáticos.

8.6. REFERENCIAS

Albariño R., Venturino A., Montagna C.M., pechen de D'Angelo A.M. (2007) Environmental effect assessment of Magnacide H. herbicide at Río Colorado irrigation channels (Argentina). Tier 4: in situ survey on benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 183–189.

Anguiano, O. L., Castro, C., Venturino, A. and Ferrari, A. (2012). Acute toxicity and biochemical effects of azinphos methyl in the amphipod *Hyaella curvispina*. *Environ. Toxicol.* 1522-7278.

ANZECC and ARMCANZ (Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand) (2000). National Water Quality Management Strategy Paper No 4. ANZECC and ARMCANZ, Canberra.

<http://www.environment.gov.au/water/publications/quality/pubs/nwqms-intro-4a.pdf>

Badii M.D., Almanza V.G. (2005) Monitoreo Biológico como Herramienta Esencial en la Evaluación del Riesgo Ecológico y el Impacto Ambiental. *CULCyT*, Año 2, No 7.

Castillo Morales G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de la calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Castillo G. (Ed.). México. <http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ecotoxicologia/links.html>

CCME (Canadian Environmental Quality Guidelines) (1999) Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.

CCME (2008) Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Chlorpyrifos. Canadian Environmental Quality Guidelines. Canadian Council of Ministers of the Environment . ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/164

De Paggi J., Susana B. (1997) Efectos de los pesticidas sobre el zooplancton de las aguas continentales: análisis revisivo. *Revista FABICID*, (1): 103-114.

Dirección de Desarrollo Sectorial Sostenible del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de la República de Colombia (2007) Manual de evaluación y gestión de riesgo asociado a los COP. ISBN: 978-958-97978-6-0.

http://siscop.ine.gob.mx/descargas/pnis/colombia_evaluacion_y_gestion_del_riesgo.pdf

ECOFRAM (Ecological Committee on FIFRA Risk Assessment Methods) (1999a) Terrestrial Draft Report.

<http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk/terrreport.pdf>

ECOFRAM (Ecological Committee on FIFRA Risk Assessment Methods) (1999b) Aquatic Report.

<http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk/aquareport.pdf>

EU (European Union) (2001) Working document—guidance document on aquatic ecotoxicology in the context of the Directive Anex I 91/414/EEC. Directorate E—Food Safety; plant health, animal health, welfare, international questions, 62 pp.

Jergentz S., Mugni H., Bonetto C., Schulz R. (2005) Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61: 817–826.

Lopez H., Miquelarena A. M., Menni R. C. (1987). Lista comentada de los peces continentales de Argentina.

<http://aquaticcommons.org/1655/>

Mayer F.L., Ellersieck M.R. (1986) Manual of acute toxicity: Interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. U.S. Dept. Int., Fish & Wildlife Serv., Resource Publ. 160. Citado en: En: Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación (2005). Clorpirifos. Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a clorpirifos.

Liendro N., Ferrari A., Venturino A. (2011) Alteraciones bioquímicas en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a concentraciones subletales de clorpirifos. *Acta Toxicol. Argent.*, 19 (40). ISSN 0327-9286. XVII Congreso Argentino de Toxicología, Tandil, Buenos Aires, Argentina.

Montagna M.C. (2010) Toxicidad de clorpirifos como elemento activo de un formulado comercial en juveniles del cangrejo *Trichodactylus borellianus*. *Natura Neotropicalis*, 41.

Montagna C., Pechen de D'Angelo A.M., Venturino A. (2011) Toxicology of the herbicide acrolein: risk assessment in aquatic environments. *Herbicides and Environment*, 19: 405-420.

Moore M.T., D.B. Huggett W.B. Gillespie Jr., Rodgers J.H. and Cooper C.M. (1998). Comparative toxicity of chlordane, chlorpyrifos, and aldicarb to four aquatic testing organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34: 152-157

Mugni H., Ronco A., Bonetto C. (2011) Insecticide toxicity to *Hyalella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 350–354.

Mugni H., Demetrio P., Paracampo A., Pardi M., Bulus G., Bonetto C. (2012) Toxicity persistence in runoff water and soil in experimental soybean plots following chlorpyrifos application. *Bull Environ Contam Toxicol*, 89(1): 208-12.

Munn M.D., Gilliom R.J. (2001). Pesticide Toxicity Index for Freshwater Aquatic Organisms. U.S. Geological survey Water-Resources Investigations Report 01-4077. National water-quality assessment program. Sacramento, California.
<http://pubs.usgs.gov/wri/wri014077/wri014077.pdf>

Qu C.S., Chen W., Bi J., Huang L., Li F.Y. (2011). Ecological risk assessment of pesticide residues in Taihu Lake wetland, China. *Ecological Modelling*, 222: 287–292.

Simon D., Helliwell S. and Robertson D. (1995). The impact of chlorpyrifos on an enclosure system in a shallow billabong. *Australas. J. Ecotoxicol.* 1: 137-142.

Solomon K.R., Baker D.B., Richards R.P., Dixon K.R., Klaine S.J., La Point T.W., Kendall R.J., Weisskopf C.P., Giddings J.M., Giesy J.P., Hall L.W., Williams W.M. (1996). Ecological risk assessment for atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol. Chem.*, 15: 31–76.

Sotomayor V., Lascano C., Pechén de D'Angelo A.M., Venturino A. (2012) Developmental alterations in *Rhinella arenarum* embryos caused by the exposure to the organophosphate Chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31: 2052-2058.

Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación (2005). Clorpirifos. Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a clorpirifos.

<http://www.pnuma.org/agua-miaac/CODIA%20CALIDAD%20DE%20LAS%20AGUAS/MATERIAL%20ADICIONAL/PONENCIAS/PONENTES/Tema%205%20Niveles%20Guias%20Calidad%20de%20Aguas/NIVELES%20GUIA/4%20-%20Desarrollos/clorpirifos.pdf>

Turner L. (2003) Chlorpyrifos Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead. Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs.
<http://www.epa.gov/espp/litstatus/effects/chlorpyrifos-analysis.pdf>

USEPA (1986). Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Chlorpyrifos. U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development Environmental Research Laboratories. Minnesota. Rhode Island.

USEPA (1992). Framework for Ecological Risk Assessment. EPA/630/R-92/001. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC.

http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/FRMWRK_ERA.PDF

USEPA (1998). Guidelines for Ecological Risk Assessment. EPA/630/R-95/002. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC.

<http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/ECOTXTBX.PDF>

USEPA (1999) Reregistration eligibility science chapter for chlorpyrifos fate and environmental risk assessment chapter. Office of prevention, pesticides and toxic substances. Washington D.C.

[ftp://marine.calpoly.edu/Weston/Sac%20Regional/03%20Other%20Reports%20\(SRCSD_OTHER\)/SRCSD_OTHER_024.pdf](ftp://marine.calpoly.edu/Weston/Sac%20Regional/03%20Other%20Reports%20(SRCSD_OTHER)/SRCSD_OTHER_024.pdf)

USEPA/EFED (Environmental Fate and Effects Division). (2000) Technical Progress Report of the Implementation Plan for Probabilistic Ecological Assessments: Aquatic Systems.

<http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2000/april/probaq.pdf>

USEPA/IREDD (2002). Interim Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos. EPA 738-R-01-007. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. WASHINGTON D.C. http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDDs/chlorpyrifos_ired.pdf

USEPA (2003) Evaluation of Minimum Data Requirements For Acute Toxicity Value Extrapolation With Aquatic Organisms. EPA 600/R-03/104. Office of Science and Technology and Office of Research and Development, Washington, D.C.

Van Straalen N.M., Van Rijn J.P. (1998) Ecotoxicological Risk Assessment of Soil Fauna Recovery from Pesticide Application. Review of Environmental Contamination and Toxicology 154, 83-141.

Van Wijngaarden R., Van den Brink P.J., Crum S.J.H., Oude Voshaar J.H., Brock T.C.M., Leeuwangh P. (1996) Effects of the insecticide Dursban 4E (active ingredient Chlorpyrifos) in outdoor experimental ditches: I. Comparison of short-term toxicity between the laboratory and the field. Environ. Toxicol. Chem., 15(7): 1133-1142.

Venturino A., Montagna C.M., Pechén D'Angelo A.M. (2007) Risk Assessment of Magnacide H Herbicide at Río Colorado irrigation Channels (Argentina). Tier 3: Studies of Native Species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 177–182.

Wheeler J.R., Grista E.P.M., Leunga K.M.Y., Morritta D., Crane M. (2002) Species sensitivity distributions: data and model choice. *Marine Pollution Bulletin*, 45: 192–202.

-CAPÍTULO 9-

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados de esta tesis contribuyen con información de importancia a la hora de comprender la diseminación y el comportamiento del pesticida clorpirifos tan ampliamente utilizado en toda la República Argentina. Siendo el insecticida más vendido en todo el país es fundamental que se considere esta información de base a la hora de su aplicación y que se tomen medidas por parte de los organismos gubernamentales de control para evitar mayores consecuencias en los ecosistemas acuáticos nacionales.

Se estudió el comportamiento del clorpirifos sobre matrices sólidas (suelos y sedimentos) tomando en cuenta la influencia de la composición química de la matriz y la concentración inicial de clorpirifos utilizada en los experimentos.

Utilizando el compuesto comercial puro (98%) se observó menor recuperación cuando los experimentos se realizaron con la matriz con mayor contenido de materia orgánica y menor pH. En todas las experiencias realizadas, se observó que los porcentajes de recuperación del clorpirifos variaban según las concentraciones iniciales empleadas, siendo menores a mayor concentración inicial del producto. Debido a que esta sustancia se emplea conjuntamente con compuestos tensioactivos, es conveniente estudiar el efecto de las formulaciones al realizar estudios de su comportamiento en el ambiente.

Al analizarse el comportamiento de un formulado comercial (48% de clorpirifos), se observó el efecto contrario, ya que los porcentajes de recuperación aumentaron con el aumento de la concentración inicial aplicada sobre el suelo, hasta que se alcanzó una concentración aproximada de 25 ppm, a partir de la cual la recuperación comenzó a disminuir. En los campos, donde este pesticida se utiliza varias veces en cada cosecha, una

mayor aplicación significa un mayor aporte a los cuerpos de agua aledaños debido a la escorrentía. Esto generaría como consecuencia, una mayor contaminación de los ríos y arroyos superficiales, y de la biota existente en los mismos.

Cuando se estudió la persistencia de esta formulación sobre un suelo agrícola de la provincia de Buenos Aires se observó que los tiempos de vida media a las concentraciones ensayadas de 3 y 6 ppm fueron de 15,06 y 5,68 días. La escasa diferencia en los tiempos de vida media que se observan cuando varía la concentración inicial de clorpirifos, podría deberse a que las concentraciones utilizadas en estas experiencias no hayan sido lo suficientemente altas como para modificar la actividad microbiana del suelo o su diversidad.

El comportamiento del clorpirifos sobre matrices sólidas va más allá de la composición química del suelo ya que la dependencia con la concentración inicial persiste a pesar de las variaciones de los parámetros químicos de las matrices sólidas utilizadas. Este comportamiento podría deberse a efectos cooperativos y deberían tenerse en cuenta al estudiar el comportamiento ambiental del pesticida.

Respecto a los estudios realizados sobre agua, sedimento y biota en ambientes acuáticos del partido de Tres Arroyos, este compuesto ha sido hallado en todas las matrices analizadas (sólidas, líquidas y biológicas), en todos los sitios y períodos muestreados, teniendo relación con las actividades agropecuarias de la zona y con las características edafoclimáticas.

En relación a la concentración de clorpirifos en agua y sedimentos del partido de Tres Arroyos, se observó una variación estacional con los tipos de cultivos producidos en la zona. Los mayores valores de concentración de este insecticida en agua ($\mu\text{g/l}$) se observaron durante el 2009, tanto en la campaña de invierno como de verano. En el caso de los sedimentos, las concentraciones halladas en los meses de diciembre de 2009 y 2010 fueron las más altas siendo también de importancia las de junio de 2009. No se observó una correlación entre las concentraciones de clorpirifos en el agua y en los sedimentos de los diferentes arroyos, debido a que los segundos suelen ser sumideros de los pesticidas durante mucho más tiempo. Por otra parte, las historias de fumigación entre los arroyos 1 y 2 de Tres Arroyos parecerían ser muy similares pero no así entre el inicio y la desembocadura del arroyo Claromecó. Esto se debería a la influencia de los campos circundantes y a la llegada aguas debajo de los agroquímicos aplicados sobre los recorridos de estos arroyos. A partir de los resultados obtenidos para el agua y el sedimento en las distintas campañas realizadas,

podemos inferir que existe una variación estacional de las concentraciones obtenidas de clorpirifos que se relacionan con los tipos de cultivos producidos en la zona.

En el análisis de la biota acuática el clorpirifos fue detectado en todas las muestras de tejidos analizadas. Su concentración varió con el tipo de tejido y el contenido graso de los mismos, sugiriendo bioacumulación de éste. En todas las especies de peces analizadas se observó una mayor concentración del insecticida en cerebro, hígado y gónadas que son los órganos que poseen mayor contenido graso. Las mayores concentraciones se hallaron en ejemplares de *R. quelen* (Bagre sapo) y *A. facetus* (Chanchita) que son especies que viven asociadas al fondo, sugiriendo que el hábitat de las especies es de suma importancia en la concentración de Clorpirifos hallada en los tejidos. En *O. jenynsii* y *A. facetus* se observó que los machos se encontraban el doble de contaminados que las hembras y en la especie *R. quelen* se registró una concentración en hembras que fue 10 veces a la registrada en machos. Estos resultados podrían relacionarse con la época en la que fueron capturados los animales y con otros factores propios de cada especie como el estado fisiológico de los animales y la biotransformación. Los cangrejos presentaron menores concentraciones de este insecticida y esto podría estar relacionado con el menor tiempo de vida y los mecanismos de detoxificación de la especie. Las hembras presentaron una mayor concentración de clorpirifos en las branquias, mientras que en los machos fue mayor en el músculo.

Los estudios con larvas de *R. arenarum* estarían confirmando la presencia de trazas de contaminantes orgánicos en el agua de Tres Arroyos y Claromecó determinada analíticamente, debido a que se observó en las diferentes muestras una inducción del sistema antioxidante: catalasa, GST y GSH. Nuestros resultados no han permitido obtener una clara relación causa-efecto del clorpirifos con los cambios obtenidos en los sistemas antioxidantes y en algunas de las enzimas detoxificantes en *R. arenarum*, teniendo en cuenta que varios compuestos pueden generar estos cambios en estos organismos y que son capaces de interactuar químicamente cuando se combinan en una mezcla. A pesar de ello podemos suponer que la calidad de agua de algunos de los arroyos de Claromecó y Tres Arroyos no es apta para la biota acuática, dado que parece generar en especies sensibles como *R. arenarum* cambios fisiológicos que podrían disminuir su supervivencia.

Si bien el análisis de riesgo es preliminar, de acuerdo a nuestros resultados debería de ser cercano a los 0,0005 µg/l para asegurar la protección del 95% de las especies.

Los análisis de las concentraciones de nutrientes (nitrato, fosfato) en el agua no indicaron una relación directa entre la cantidad de precipitaciones y las concentraciones halladas de nitratos y fosfatos, probablemente porque las aplicaciones no coincidieron con los efectos de esorrentía. Los valores de fósforo fueron de mayor importancia en las campañas de primavera-verano, siendo coincidentes con las aplicaciones para la soja. Los altos valores de este nutriente podrían estar indicando otras fuentes además de la de fertilización como ser la degradación del pesticida glifosato.

Considero que los datos obtenidos en esta tesis ayudarán a comprender el comportamiento del clorpirifos en el ambiente.

-ANEXO AI-

CRITERIO DE CALIDAD DE SEDIMENTOS (SQC)

AI.1. INTRODUCCIÓN

La capa de sedimento es un elemento fundamental de los ecosistemas acuáticos ya que proporciona hábitat y alimento a la fauna acuática, además de mantener su estructura y funciones. La información mundial indica que se hallan contaminados con diversas sustancias tóxicas y bioacumulables. Las propiedades químicas y físicas de los compuestos orgánicos, así como también los factores ambientales y las características propias de los sedimentos contribuyen a la acumulación de estos químicos en los mismos y a su biodisponibilidad para la biota (Fojut *et al.*, 2011; Peltzer *et al.*, 2013).

Normalmente, para poder tomar decisiones sobre las acciones de remediación de ambientes deteriorados (eliminación o no de fuentes de contaminación, dragado de cursos de agua, selección de sitios de disposición de sedimentos provenientes de dragado, etc.), se definen niveles de exposición de la biota a químicos que causen perjuicio sobre el cuerpo de agua. Sin embargo, los niveles guía de calidad del agua por sí solos pueden no ser suficientes a la hora de la toma de decisiones (Peluso, 2011), ya que muchos productos químicos orgánicos tienden a acumularse en el sedimento una vez liberados al ambiente, y pueden causar toxicidad incluso cuando se cumplen los criterios de calidad del agua. Por ello, se han desarrollado diferentes índices de calidad de sedimentos para los ecosistemas de agua dulce. Diferentes conjuntos de "Sediment Quality Guidelines" (SQG), guías de calidad de sedimentos,

se pueden utilizar dependiendo de la finalidad de la evaluación, de cómo los valores se van a utilizar y de cuánto y qué tipo de datos están disponibles. Cada método tiene sus ventajas y sus limitaciones, pero muchos científicos y gestores han utilizado estos índices para identificar contaminantes en los ecosistemas acuáticos y poder clasificar áreas de preocupación a escala regional o nacional (MacDonald *et al.*, 2000; GESCR, 2010, Fojut *et al.*, 2011).

La United States Environmental protection Agency (USEPA) en el año 1993 publicó un protocolo para estimar el criterio de calidad de los sedimentos, basándose en el modelo de la teoría de partición (Eqp) para compuestos orgánicos no iónicos (USEPA, 1993; USEPA, 2008). En este enfoque, se supone que la toxicidad es causada solamente por la fracción libre disuelta de un contaminante, y asume que ésta se halla en equilibrio entre el sedimento y el agua intersticial (agua entre las partículas de sedimento) (USEPA, 2003). También supone que la exposición a la sustancia química es equivalente en cada uno de los compartimentos ambientales y que la fauna epibentónica y bentónica poseen las mismas distribuciones de sensibilidad (Fojut *et al.*, 2011). Con este método se genera un valor numérico que puede ser utilizado como punto de referencia por debajo del cual se espera que el riesgo del clorpirifos o de cualquier otro compuesto sea mínimo (MacDonald *et al.*, 2000; GESCR, 2010, Fojut *et al.*, 2011).

Debido a la inexistencia de valores de comparación de SQG para el clorpirifos en Argentina, y a la gran diversidad de estimaciones de este tipo, en algunos casos muy difíciles de aplicar, nos basamos en el trabajo de Green y Chandler (1996) que utilizan un criterio simple utilizado por la USEPA para dicho compuesto. Esto nos permitió además tener un valor de comparación con nuestros resultados. La estimación utilizada pretende obtener un valor de SQG que permita proteger a la mayor cantidad de especies bentónicas de efectos crónicos y agudos. En nuestro país sería la primera aproximación de este tipo a este compuesto.

El SQC representa la concentración de un tóxico en los sedimentos que se prevé asociada a su concentración en el agua intersticial por debajo del valor crónico de calidad del agua. Con este índice (concentración) se prevé que se produzcan efectos adversos en muy baja proporción (Mac Donald *et al.*, 2000).

AI.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El cálculo para la obtención del SQC se realiza utilizando el valor crónico final (FCV) del producto químico como criterio de calidad del agua, y su coeficiente de partición (K_d) (Ecuación 1) (USEPA, 1992, 1997, 2008), que es una medida de la química de partición de un contaminante entre un sólido y el agua, y que puede ser normalizado a carbono orgánico (K_{oc}) para poder comparar entre los diferentes tipos de sólidos (por ejemplo, sedimentos y/o suelo) (Fojut *et al*, 2011).

Como sigue:

$$SQC = FCV * K_d \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$K_d = f_{oc} \cdot K_{oc} \quad (\text{Ecuación 2})$$

El K_{oc} es el contenido de carbono orgánico normalizado con el f_{oc} que es la fracción orgánica de la muestra (Ecuación 2) (USEPA, 2008). Este enfoque ha sido utilizado por numerosos países para el cálculo de SQC (MacDonald *et al*, 2000; GESCR, 2010; Fojut *et al*, 2011).

AI.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla AI.1 se observan los valores de SQC calculados para cada tipo de sedimento utilizando el valor de f_{oc} , K_{oc} y el criterio de calidad de agua (FCV) establecido por la Unión Europea de 0,001 $\mu\text{g/l}$.

El valor promedio de SQG (0,022 $\mu\text{g/Kgoc}$; $=2,2 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{g/goc}$) hallado por nosotros es más de mil veces menor al valor estimado por Green y Chandler (1996) de 38 μg de clorpirifos/Kg de sedimentos y de más de cinco ordenes de diferencia menor al estimado por la EPA de 5,3 $\mu\text{g/goc}$ (Kemble *et al.*, 2002)

Tabla AI.1. Valores de SQC estimados para cada tipo de sedimento obtenidos con las ecuaciones 1 y 2. *Fuente: EPA (1997)

Muestras	% de Materia orgánica	f_{oc}	K_{oc} (l/kg)	SQC ($\mu\text{g/Kg}$)	SQC ($\mu\text{g/goc}$)*
A° 1	0,64	0,006	5569	0,036	$3,6 \cdot 10^{-5}$
A° 2	1,26	0,013	3675	0,046	$4,6 \cdot 10^{-5}$
A° 3	0,96	0,010	5983	0,057	$5,7 \cdot 10^{-5}$
Inicio del A° Claromecó	0,86	0,009	5983	0,051	$5,1 \cdot 10^{-5}$
Desembocadura del A° Claromecó	0,64	0,006	5569	0,036	$3,6 \cdot 10^{-5}$

El % de materia orgánica fue calculado por el laboratorio de suelos de la Facultad de agronomía de la Universidad de Buenos Aires; el valor de f_{oc} corresponde al % MO/100; Los valores de K_{oc} se obtuvieron de bibliografía (Gebremariam *et al.*; 2011), debido a que los mismos se correspondieron con los % de materia orgánica de nuestros suelos. La EPA utiliza la siguiente fórmula para la estimación de SQC ($\mu\text{g/goc}$) = FCV ($\mu\text{g/l}$) $\cdot f_{oc}$ $\cdot K_{oc}$ (l/kg) $\cdot 1 \cdot 10^{-3}$ (kgoc/goc).

En nuestro caso, al igual que lo concluido por Green & Chandler (1996), el valor hallado no aseguraría la protección de toda la fauna bentónica, ya que cuándo este valor de SQG se compara con los valores de toxicidad crónica de la tabla de LOEC o NOEC utilizados en el análisis de riesgo del capítulo 9, se observa que éste no estaría protegiendo a un 10% de las especies como *Culex sp*, *Chironomus sp* y *Mysidopsis sp*.

AI.4. CONCLUSIONES

Finalmente, podemos decir que los contaminantes tóxicos como el clorpirifos asociados a los sedimentos del fondo de los cuerpos de agua pueden ocasionar una continua degradación del medio ambiente, incluso cuando las concentraciones de los compuestos en la columna de agua cumplen con las normas establecidas, o aún cuando las fuentes de contaminación han cesado. Por ello, es importante que las agencias reguladoras estimen algún parámetro o índice que les permita tomar decisiones sobre los sedimentos para que se protejan los ecosistemas acuáticos y su biota asociada.

Este análisis pretende ser una primera aproximación a un valor que permita establecer un límite de protección para la mayor cantidad de especies asociadas a los sedimentos del fondo, pero que no alcanza para proteger a todas las especies existentes dentro de las comunidades acuáticas.

AI.5. REFERENCIAS

Fojut T., Vasquez M. E., Tjeerdema R. S. (2011). Methodology for Derivation of Pesticide Sediment Quality Criteria for the Protection of Aquatic Life Phase I: Review of Existing Methodologies. Report prepared for the Central Valley Regional Water Quality Control Board. Department of Environmental Toxicology, University of California, Davis.

Gebremariam S.Y., Beutel M.W., Flury M., Harsh J.B., Yonge D.R. (2011) Nonsingular Adsorption/Desorption of Chlorpyrifos in Soils and Sediments: Experimental Results and Modeling. Environ. Sci. Technol 46: 869–875.

Green A. S., Chandler G. T. (1996) Life-Table Evaluation of Sediment-Associated Chlorpyrifos Chronic Toxicity to the Benthic Copepod, *Amphiascus tenuiremis*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 77-83.

Guidance on Evaluating Sediment Contaminant Results (GESCR) (2010) Division of Surface Water, Standards and Technical Support Section. OHIO, Environmental Protection Agency.

http://www.epa.ohio.gov/portals/35/guidance/sediment_evaluation_jan10.pdf

Kemble N. E., Ingersoll C.G., Kunz J.L. (2002) Toxicity Assessment of Sediment Samples Collected From North Carolina Streams. Columbia Environmental Research Center, Biological Resources Division, United States Geological Survey, Columbia, MO, 65201, U.S.A. Final Report CERC-8335-FY03-20-01.

MacDonald D.D., Ingersoll C.G. y Berger T.A. (2000) Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 39: 20–31.

Peluso M. L. (2011) Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes. Tesis Doctoral desarrollada en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente, CIMA, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata.

Peltzer P.M., Lajmanovich R.C., Attademo A.M., Junges C.M., Cabagna-Zenklusen M.C., Repetti M.R., Sigrist M.E., Beldoménico H. (2013) Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. Ecotoxicology and Environmental Safety, 98: 142-151

USEPA (1992) Inventory of organic and metal contamination in Massachusetts Bay, Cope Cod Bay, and Boston harbor sediments, and an assessment of regional sediment quality. EPA 171/R-92/013.

USEPA (1993) Guidelines for Deriving Site-Specific Sediment Quality Criteria for the protection of Benthic Organisms. EPA 822/R-93/017. Office of Science and Technology and Office of Research and Development, Washington, D.C.

USEPA (1997) The incidence and severity of sediment contamination in surface waters of the United States. Volume 1, National Sediment Quality Survey. EPA 823/R-97/006.

USEPA (2003) Evaluation of Minimum Data Requirements For Acute Toxicity Value Extrapolation With Aquatic Organisms. EPA 600/R-03/104. Office of Science and Technology and Office of Research and Development, Washington, D.C.

USEPA (2008) Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms Compendium of Tier 2 Values for Nonionic Organics. EPA/600/R-02/016. Office of Science and Technology and Office of Research and Development, Washington, D.C.

http://www.epa.gov/nheerl/download_files/publications/ESB_Compendium_v14_final.pdf

-ANEXO AII-

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Este trabajo de tesis dio origen a las siguientes publicaciones y presentaciones en reuniones científicas.

AII.1. PUBLICACIONES

AII.1.1 REVISTAS INTERNACIONALES

Alvarez M., du Mortier C., Fernández Cirelli A. (2013) Behaviour of insecticide chlorpyrifos on soils and sediments with different organic matter content from Provincia de Buenos Aires, República Argentina. Water, Air & Soil Pollution, 224: 1453-1458.

Alvarez M., du Mortier C., Sokolic T., Fernández Cirelli A. (2013) Studies on the persistence of a commercial formulation of chlorpyrifos on an agricultural soil from Provincia de Buenos Aires, República Argentina. Water, Air & Soil Pollution, 224: 1571-1576.

AII.2. CONGRESOS

AII.2.1. CONGRESOS NACIONALES

5° Congreso Argentino de Limnología. Del 28 de noviembre al 1 de diciembre de 2012, FHUC-UNL, Santa Fé, Argentina. "Nivel de nutrientes en aguas superficiales del partido de Tres Arroyos y su relación con las actividades agropecuarias". Alvarez, M. y Du Mortier C. (Exposición mural)

IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina “Armonizando esfuerzos científicos y política ambiental”. Del 16 al 19 de octubre de 2012, Buenos Aires, Argentina. “Respuestas de marcadores bioquímicos en larvas de *Rhinella arenarum* expuestas a muestras de agua de la zona agrícola del partido de Tres Arroyos”. Álvarez M., Lascano C.I. y Venturino A. (Exposición mural)

XXIX Congreso Argentino de Química “Centenario de la Asociación química Argentina”. Del 3 al 5 de Octubre de 2012, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. “ESTUDIOS DE PERSISTENCIA DE CLORPIRIFOS EN UN SUELO AGRÍCOLA DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA”. Melina Álvarez, Cecile du Mortier, Tea Sokolic y Alicia Fernández Cirelli. (Exposición mural)

II Jornadas Interdisciplinarias “Ciclo del Agua en Agroecosistemas”. Del 12 al 14 de septiembre de 2012, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. “Evidencias de clorpirifos en *Cyrtograpsus angulatus* (cangrejo de las rocas) en el arroyo Claromecó, provincia de Buenos, Argentina”. Alvarez M., Ramis L., du Mortier C, Fernandez Cirelli A. (Exposición mural)

II jornadas de jóvenes Investigadores en Ciencias Veterinarias. Del 14 al 15 de Junio de 2012, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. “Nivel de nutrientes (nitrato y fosfato disuelto) en aguas superficiales del partido de Tres Arroyos” Melina Alvarez y Cecile Du Mortier. (Exposición oral)

XVII Congreso Argentino de Toxicología. Del 29 de septiembre al 1 de Octubre de 2011, Universidad del Centro, Tandil, Buenos Aires, Argentina. “Presencia de Clorpirifos en ambientes acuáticos del partido de Tres Arroyos. Relación con las Actividades agrícolas”, Melina Álvarez, Cecile du Mortier y Alicia Fernández Cirelli. (Exposición mural)

II Jornadas Patagónicas de Biología. I Jornadas Patagónicas de Ciencias Ambientales. IV Jornadas Estudiantiles de Ciencias Biológicas. Del 21 al 23 de septiembre de 2011, Facultad de

Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew, Chubut, Argentina. "PRESENCIA DE CLORPIRIFOS EN BIOTA ACUÁTICA DEL PARTIDO DE TRES ARROYOS, PROVINCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA" Melina Álvarez, Cecile du Mortier y Alicia Fernández Cirelli. (Exposición mural)

XII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas en Ciencias Veterinarias. Jornada Nacional de Divulgación Técnico Científica 2011. El día 16 de septiembre de 2011. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario, Universidad del litoral, Esperanza, Santa Fé, Argentina. "Presencia del insecticida clorpirifos en ambientes acuáticos del Partido de Tres Arroyos (Provincia de Buenos Aires)", Melina Álvarez, Cecile du Mortier y Alicia Fernández Cirelli. (Exposición mural)

Jornada de investigadores jóvenes en Ciencias Veterinarias. Del 16 al 17 de junio de 2011. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. "EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO AMBIENTAL DE PESTICIDAS EN DIFERENTES ZONAS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA". (Exposición oral)

II Jornada Científica Institucional "Las ciencias agrarias y ambientales desde diferentes enfoques y niveles de análisis". El 20 de mayo de 2011. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. "Comportamiento ambiental del clorpirifos". Melina Alvarez. (Exposición oral)

1ra JORNADAS INTERDISCIPLINARIAS "CICLO DEL AGUA EN AGROECOSISTEMAS". Del 15 al 17 de septiembre de 2010, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. "EL PESTICIDA CLORPIRIFOS EN AGUAS SUPERFICIALES Y BIOTA DEL PARTIDO DE TRES ARROYOS (PROVINCIA DE BUENOS AIRES)". Melina Álvarez, Cecile du Mortier y Alicia Fernández Cirelli. (Exposición mural)

IV Reunión Binacional de Ecología. Del 8 al 13 Agosto de 2010, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. "Presencia del pesticida clorpirifos en *Australoheros facetus* (Chanchita) de ambientes acuáticos del partido

de Tres Arroyos, provincia de Buenos Aires”. Álvarez, M., du Mortier, C. y Fernández Cirelli, A. (Exposición mural)

Jornada de Becarios. El 16 de Junio de 2010, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. “EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO AMBIENTAL DE PESTICIDAS EN DIFERENTES ZONAS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA”. Melina Alvarez. (Exposición oral y mural)

III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental. SETAC “Ecotoxicología: reflexiones en el año del Bicentenario”. Del 12 al 14 de Mayo de 2010, Ciudad de Santa Fe, Argentina. “Nuevas evidencias de la presencia del pesticida clorpirifos en aguas superficiales del partido de Tres Arroyos (provincia de Buenos Aires)”. Melina Alvarez, Maria Laura Ramos, Cecile du Mortier y Alicia Fernández Cirelli. (Exposición mural)

1st Argentinean Workshop in Environmental Science, Ciudad de Santa Fe, Argentina. Del 23 al 25 de Noviembre de 2009. “Evidencias de la presencia del pesticida clorpirifos en Biota Acuática del Arroyo Claromecó (Provincia de Buenos Aires)”. Melina Alvarez, Cecile du Mortier y Alicia Fernández Cirelli. (Exposición mural)

X Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral - II Reunión Argentina de Ciencias Naturales. Del 18 al 21 de octubre de 2009. INALI, UNL-CONICET y FHUC-UNL, Ciudad de Santa Fe, Argentina. “Evidencias de la presencia del pesticida clorpirifos en *Oligosarcus jenynsii* de la provincia de Buenos Aires”. Melina Alvarez, Cecile du Mortier y Alicia Fernández Cirelli. (Exposición mural)

Congreso de Ciencias Ambientales – COPIME. Del 7 al 9 de Octubre de 2009, Capital Federal, Buenos Aires, Argentina. “Comportamiento Ambiental de Pesticidas en la provincia de Buenos Aires. Resultados Preliminares”. Melina Alvarez. (Exposición mural)

Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental – VI Reunión SETAC. Del 26 al 28 de Noviembre de 2008, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. “Estudios

preliminares para la evaluación del riesgo de contaminación con el insecticida clorpirifos en la provincia de Buenos Aires”. Melina Alvarez, Cecile du Mortier y Alicia Fernández Cirelli. (Exposición mural)

XXVII Congreso Argentino de Química “Dr. Pedro José Aymonino”. Del 17 al 19 de Septiembre de 2008, San Miguel de Tucumán, Argentina. “Influencia de la formulación en la interacción del insecticida endosulfán con suelos de la provincia de Buenos Aires. Hernán Agostini, Cecile du Mortier, Melina Alvarez, Maria Laura Ramos, Alicia Fernández Cirelli. (Exposición mural)

AII.2.2. CONGRESOS INTERNACIONALES

XVI Jornadas de Jóvenes investigadores, AUGM. Del 27 al 29 de Octubre de 2008, Montevideo, Uruguay. “Evaluación del Riesgo de Contaminación de ambientes acuáticos con el insecticida clorpirifos. Melina Alvarez. Trabajo completo publicado en libro de resúmenes y CD. Datos de la publicación: ISBN del libro de resúmenes: 978-9974-0-0528-0 e ISBN Cd es 978-9974-0-0529-7. (Exposición oral y mural)